

Aus der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie
Direktor: Frau Prof. Dr. med. Mechthild Krause

Modulation der radiogenen Mucositis enoralis im Tiermodell (Maus) durch Glutathion

Dissertationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Gesundheitswissenschaften

Doctor rerum medicinalium

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus

der Technischen Universität Dresden

von Dipl.-Biol. Dana Großmann
aus Bautzen

Dresden 2017

1. Gutachter: Prof. Dr.med. vet. et rer. medic. Wolfgang Dörr

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2018

Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Enhardt

Vorsitzender der Prüfungskommission

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	X
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Kopf-Hals-Tumoren.....	3
2.1.1 Epidemiologie	3
2.1.2 Therapie von Kopf-Hals-Tumoren	4
2.2 Strahlenreaktionen der Normalgewebe	9
2.2.1 Frühe Strahlenreaktionen.....	9
2.2.2 Chronische Strahlenreaktionen	10
2.2.3 Konsekutive Strahlenreaktionen.....	11
2.2.4 Klassifikationssysteme für Nebenwirkungen der Strahlentherapie.....	11
2.3 Strahlenreaktion der Mundschleimhaut	12
2.3.1 Klinische Bedeutung	12
2.3.2 Klinischer Verlauf der radiogenen Mucositis enoralis	13
2.3.3 Dokumentation/Klassifizierung der radiogenen oralen Mukositis	14
2.3.4 Prophylaxe und Therapie der radiogenen oralen Mukositis	18
2.4 Weitere Nebenwirkungen der Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich.....	22
2.4.1 Geschmacksveränderungen	22
2.4.2 Radiogene Xerostomie.....	22
2.4.3 Strahlenkaries	23
2.4.4 Infizierte Osteoradionekrose (IORN)	24
2.4.5 Trismus	25
2.5 Aufbau und proliferative Organisation der Mundschleimhaut.....	25
2.5.1 Allgemeine Anatomie und Histologie der Mundhöhle	25
2.5.2 Humane Mundschleimhaut.....	26
2.5.3 Murine Mundschleimhaut	27
2.6 Tiermodelle zur Untersuchung der radiogenen oralen Mukositis	29
2.6.1 Maus	29
2.6.2 Hamster	30
2.6.3 Ratte	31
2.7 Einflussfaktoren der Strahlenempfindlichkeit von Geweben	31
2.7.1 Intrinsische Strahlenempfindlichkeit	31
2.7.2 Recovery (Erholung)	33

2.7.3	Repopulierung.....	33
2.7.4	Redistribution	34
2.7.5	Reoxygenierung.....	35
2.7.6	Volumeneffekt.....	35
2.8	Der Sphingomyelin-Signalweg	37
2.8.1	Sphingomyelin	37
2.8.2	Ceramide	37
2.8.3	Sphingomyelinasen.....	38
2.8.4	Ceramidsynthase	39
2.8.5	Modulation des Sphingomyelin-Signalweges	40
2.8.6	Apoptose.....	42
2.9	Zielstellung der vorliegenden Arbeit	44
3	Material und Methoden.....	46
3.1	Versuchstiere.....	46
3.2	Versuchsdurchführung	47
3.2.1	Bestrahlungsmethoden	47
3.2.2	Makroskopische Beurteilung der Strahlenreaktion.....	51
3.2.3	Glutathionbehandlung	51
3.3	Beschreibung der Experimente.....	52
3.3.1	Lokale Einzeitbestrahlung (Versuche M1/x)	52
3.3.2	Alleinige Applikation von Glutathion (Versuch M/0)	53
3.3.3	Fraktionierte Bestrahlung	53
3.4	Histologische Untersuchungen (Versuche H/x)	54
3.4.1	Bestrahlungsprotokoll.....	54
3.4.2	Zungenentnahme und Fixierung.....	54
3.4.3	Hämatoxilin-Eosin-Färbung.....	54
3.4.4	Immunhistochemische Färbungen	55
3.4.5	Auswertung der Schnitte	63
3.5	Statistische Auswertung.....	63
3.5.1	Dosis-Effekt-Analysen.....	63
3.5.2	Zeitlicher Verlauf der Strahlenreaktion	64
3.5.3	Histologische Untersuchungen.....	64
4	Ergebnisse	65
4.1	Alleinige Applikation von Glutathion	65
4.2	Klinische Veränderungen der Mundschleimhaut nach Einzeitbestrahlung.....	66
4.2.1	Lokale Einzeitbestrahlung (Versuch M1/0)	66
4.2.2	Dosisabhängigkeit der Ulkusfrequenz	67

4.2.3	Zeitlicher Verlauf	67
4.2.4	Sonstige Effekte der Einzeitbestrahlung	70
4.3	Einfluss von Glutathion auf die Strahlenreaktion des Zungenepithels nach Einzeitbestrahlung (Versuche M1/1, M1/2)	71
4.4	Konventionell fraktionierte Bestrahlung	73
4.4.1	Alleinige Bestrahlung (Versuche M2/0, M3/0)	73
4.4.2	Bestrahlung mit 5 x 3 Gy und Glutathionapplikation (Versuche M2/1 – M2/3) ..	76
4.4.3	Bestrahlung mit 10 x 3 Gy und Glutathionapplikation (Versuche M3/1 - M3/5) ..	79
4.5	Histologische Untersuchungen	82
4.5.1	Histologie des unbehandelten Epithels	82
4.5.2	Bestrahlung und Behandlung mit Inhibitoren der Sphingomyelinsynthese	83
4.6	Immunhistochemische Untersuchungen	89
4.6.1	Proliferationsmarker Ki-67	89
4.6.2	Aktivierte Caspase-3	92
4.6.3	Neutrale Sphingomyelinase1	97
4.6.4	Ceramide	98
4.6.5	Bcl-2	99
4.6.6	Bax	102
5	Diskussion	103
5.1	Radiogene Mucositis enoralis	103
5.2	Bedeutung von Glutathion für die radiogene Mucositis enoralis	104
5.3	Zungenepithel der Maus als Tiermodell	105
5.3.1	Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen	105
5.3.2	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	106
5.3.3	Strahlenreaktion der Mundschleimhaut nach fraktionierter Bestrahlung	107
5.4	Applikation und Verträglichkeit von Glutathion	108
5.5	Modulation der radiogenen Mucositis enoralis durch Glutathion	108
5.5.4	Wirkung von Glutathion bei Einzeitbestrahlung	109
5.5.5	Wirkung von Glutathion bei fraktionierter Bestrahlung	109
5.5.6	Wirkmechanismus von Glutathion	110
5.5.7	Weitere tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Inhibitoren des Sphingomyelin-Signalweges auf die orale Mukositis	110
5.6	Histologische Untersuchungen	111
5.6.1	Zellzahl und Dicke des unbehandelten Epithels	111
5.6.2	Einfluss einer Bestrahlung mit 5 x 3 Gy/Woche mit/ ohne einer zusätzlichen Behandlung auf die epitheliale Zellzahl	112

5.6.3	Einfluss einer Bestrahlung mit 5 x 3 Gy/Woche mit/ ohne einer zusätzlichen Behandlung auf die Epitheldicke	113
5.7	Immunhistochemische Untersuchungen	115
5.7.1	Bedeutung von Proliferationvorgängen	115
5.7.2	Expressionsmuster von nSMase1 und Ceramid.....	115
5.7.3	Apoptose.....	116
5.7.4	Immunhistochemische Untersuchungen des Gefäßendothels.....	118
5.8	Bedeutung der ceramid-vermittelten Apoptose für die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut.....	119
6	Ausblick.....	120
7	Zusammenfassung.....	121
8	Summary.....	123
9	Literaturverzeichnis	125
10	Anhang	148

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Klinisches Bild einer konfluenten <i>Mucositis enoralis</i>	13
Abb. 2:	Histologischer Aufbau der Schleimhaut der Zungenunterseite der Maus.....	28
Abb. 3:	Zellüberlebenskurven nach Einzeit- und fraktionierter Bestrahlung (modifiziert nach Herrmann et al. 2006)	32
Abb. 4:	Strukturformel von Ceramid (Kolesnick und Fuks, 2003).....	37
Abb. 5:	Vereinfachte Darstellung der Signalwege der extrinsischen und intrinsischen Apoptose (modifiziert nach Schultz und Harrington, 2003 und Lin, et al., 2006)	43
Abb. 6:	Fixierung der Tiere für die Schnauzenbestrahlung	48
Abb. 7:	Bestrahlungsanlage zur lokalen Bestrahlung der Zungenunterseite	49
Abb. 8:	Lokale Bestrahlung der Zungenunterseite	50
Abb. 9:	Gewichtsverlauf während Glutathionbehandlung über 28 Tage.....	65
Abb. 10:	Ulzerative Läsion der Zungenunterseite	66
Abb. 11:	Dosisabhängigkeit der Ulkusfrequenz nach Einzeitbestrahlung (Versuch M1/0).....	67
Abb. 12:	Ulkusprävalenz nach Einzeitbestrahlung (Versuch M1/0).....	68
Abb. 13:	Latenzzeit (links) und Ulkusdauer (rechts) in Abhängigkeit von der Strahlendosis nach Einzeitbestrahlung (Versuch M1/0).....	69
Abb. 14:	Gewichtsverlauf der Mäuse nach Einzeitbestrahlung (Versuch M1/0)	70
Abb. 15:	Dosis-Effekt-Kurven nach lokaler Einzeitbestrahlung und Glutathion- Applikation (-3/D bzw. -3/H) im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung (Kontrolle)	72
Abb. 16:	Übersicht über die ED ₅₀ -Werte der Kontrollversuche M1/0, M2/0 und M3/0	74
Abb. 17:	Ulkusprävalenz in den Kontrollversuchen M2/0 und M3/0 im Vergleich zur Einzeitbestrahlung (Versuch M1/0).....	75
Abb. 18:	ED ₅₀ -Werte nach konventionell fraktionierter Bestrahlung über eine Woche in Verbindung mit Glutathiongabe	77
Abb. 19:	Ulkusprävalenz nach einwöchiger fraktionierter Bestrahlung und Glutathionapplikation.....	78
Abb. 20:	Übersicht über die ED ₅₀ -Werte nach zweiwöchiger fraktionierter Bestrahlung mit Glutathionapplikation (M3/1 - M3/5) im Vergleich zum Kontrollversuch M3/0.....	80
Abb. 21:	Ulkusprävalenzen nach zweiwöchiger Bestrahlung und Glutathionapplikation.....	81
Abb. 22:	Histologie des Epithels der Zungenunterseite vor (A) und nach (B) Bestrahlung.....	82

Abb. 23:	Zellzahlen während und nach der Bestrahlung mit 5 x 3 Gy/Woche	85
Abb. 24:	Gesamtepitheldicke während und nach der Bestrahlung mit 10 x 3 Gy	86
Abb. 25:	Dicken der einzelnen Epithelschichten während und nach fraktionierter Bestrahlung mit 10 x 3 Gy	88
Abb. 26:	Immunhistochemischer Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67	89
Abb. 27:	Zeitlicher Verlauf der Anzahl Ki-67 positiver Zellen je mm Zungenepithel (obere Abbildung) und prozentualer Anteil Ki-67 positiver Zellen (untere Abbildung) während einer fraktionierten Bestrahlung (10 x 3 Gy)	90
Abb. 28:	Immunhistochemischer Nachweis aktivierter Caspase-3 positiver Zellen im Zungenepithel an Tag 0 (A) und an Tag 11 (B)	92
Abb. 29:	Anzahl aktivierter Caspase-3 positiver Zellen je mm Zungenepithel (ob. Abb.) und prozentualer Anteil aktivierter Caspase-3 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl (unt. Abb.)	93
Abb. 30:	Caspase-3 positive Granula im Gefäßendothel behandelter und unbehandelter Präparate	95
Abb. 31:	Nachweis Caspase-3 positiver Granula im Endothel arterieller Gefäße der Zunge	96
Abb. 32:	Immunhistochemischer Nachweis der neutralen Sphingomyelinase1	97
Abb. 33:	Immunhistochemischer Nachweis von Ceramiden im Epithel der Zungenunterseite	98
Abb. 34:	Immunhistochemischer Nachweis von bcl-2	99
Abb. 35:	Anzahl bcl-2 positiver Zellen je mm Zungenepithel (obere Abbildung) und prozentualer Anteil bcl-2 positiver Zellen (untere Abbildung) an der Gesamtzellzahl	101
Abb. 36:	Immunhistochemischer Nachweis von bax	102

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	TNM-Klassifikation von Kopf-Hals-Tumoren (Lippe, Mundhöhle) (Wittekind, 2014).....	4
Tab. 2:	Übersicht der wichtigsten Parameter unkonventioneller Fraktionierungsprotokolle (Dörr et al.1996)	6
Tab. 3:	RTOG/EORTC- Klassifikation der frühen Nebenwirkungen der Strahlentherapie an der Mundschleimhaut (nach Seegenschmiedt 1998)	14
Tab. 4:	Modifizierte RTOG/EORTC-Klassifikation für die radiogene orale Mukositis	15
Tab. 5:	Klassifikationssysteme der WHO und CTC für die radiogene orale Mukositis (NCI, 2010; WHO, 1979)	15
Tab. 6:	Dische-Klassifikation der Nebenwirkungen an der Mundschleimhaut (modifiziert nach Riesenbeck und Dörr 1998).....	17
Tab. 7:	Übersicht über die durchgeführten Versuche	52
Tab. 8:	Protokoll HE-Färbung.....	55
Tab. 9:	Färbeprotokoll für Ki-67	56
Tab. 10:	Färbeprotokoll für aktivierte Caspase-3.....	57
Tab. 11:	Färbeprotokoll für neutrale Sphingomyelinase	58
Tab. 12:	Färbeprotokoll für Ceramid.....	59
Tab. 13:	Färbeprotokoll für CD31	60
Tab. 14:	Färbeprotokoll für Bcl-2	61
Tab. 15:	Färbeprotokoll für Bax	62
Tab. 16:	Ergebnisse der lokalen Einzeitbestrahlung (Versuch M1/0).....	67
Tab. 17:	Ergebnisse der Einzeitbestrahlung	71
Tab. 18:	Ergebnisse der alleinigen fraktionierten Bestrahlung (M2/0, M3/0)	73
Tab. 19:	Ergebnisse der konventionell fraktionierten Bestrahlung über eine Woche (Versuche M2/x).....	76
Tab. 20:	Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung über zwei Wochen mit Glutathion in verschiedenen Applikationszeiträumen (M3/1 - M3/3) im Vergleich zum Kontrollversuch M3/0	79
Tab. 21:	Zelldichten und Schichtdicken des unbehandelten Epithels der Zungenunterseite (n = 20)	83
Tab. 22:	Zusammenfassung der Ergebnisse der Einzeit-Bestrahlungsversuche	107
Tab. 23:	Verlauf der absoluten und relativen Zellzahlen während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen und der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit (Versuch H0).....	153

Tab. 24:	Verlauf der absoluten und relativen Zellzahlen während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen, der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit und der Behandlung mit Glutathion (Versuch H1).....	153
Tab. 25:	Verlauf der absoluten und relativen Zellzahlen während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen, der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit und der Behandlung mit Fumonisin B1 (Versuch H2).....	154
Tab. 26:	Verlauf der absoluten und relativen Zellzahlen während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen, der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit und der Behandlung mit Desipramin (Versuch H3).....	154
Tab. 27:	Durchschnittliche Dicken (D) des Gesamtepithels und der einzelnen Epithelschichten während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen und der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit (Versuch H0).....	155
Tab. 28:	Durchschnittliche Dicken (D) des Gesamtepithels und der einzelnen Epithelschichten während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen, der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit und der Behandlung mit Glutathion (Versuch H1).....	155
Tab. 29:	Durchschnittliche Dicken (D) des Gesamtepithels und der einzelnen Epithelschichten während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen, der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit und der Behandlung mit Fumonisin B1 (Versuch H2).....	156
Tab. 30:	Durchschnittliche Dicken (D) des Gesamtepithels und der einzelnen Epithelschichten während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen, der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit und der Behandlung mit Desipramin (Versuch H3).....	156
Tab. 31:	Mittelwerte (n = 5) der Ki-67 positiven Zellen pro mm Zungenepithel. Verglichen werden die Werte der Kontrolle und der mit Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin behandelten Proben während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen und der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit.	157
Tab. 32:	Mittelwerte (n = 5) der aktivierte Caspase-3 positiven Zellen pro mm Zungenepithel. Verglichen werden die Werte der Kontrolle und der mit Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin behandelten Proben während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen und der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit.	158

Tab. 33: Mittelwerte (n = 5) der bcl-2 positiven Zellen pro mm Zungenepithel. Verglichen werden exemplarisch Werte der Kontrolle und der mit Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin behandelten Proben während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen.	158
---	-----

Abkürzungsverzeichnis

APAF-1	Apoptotic protease activating factor-1
aSMase	Acidic Sphingomyelinase (saure Sphingomyelinase)
ASTRO	American Society for Radiation Oncology
Bax	bcl-2-associated X Protein (pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie)
Bcl-2	B-cell-lymphoma 2 Protein (anti-apoptotisches Protein)
CHART	Continuous hyperfractionated accelerated radiotherapy
CLE	Consequential late effects
CTC/CTCAE v 4.03	Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 4.03
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEGRO	Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EBV	Epstein-Barr-Virus
ED ₅₀	Strahlendosis, bei der ein Effekt (Ulzeration) bei 50 % der Tiere zu erwarten ist
EORTC	European Organisation for Research and Treatment of Cancer
FADD	FAS-associated death domain protein
FB ₁	Fumonisin B ₁
FSU	functional subunit (funktionelle Untereinheiten)
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
GSH	Glutathion (reduziert), γ-L-Glutamyl-L-cysteinyl-glycin
GSSG	Glutathion (oxidiert), Glutathion-Disulfid
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HPV	Humanes Papilloma Virus
IgG	Immunglobulin G
IMRT	Intensitätsmodulierte Radiotherapie
IORN	Infizierte Osteoradionekrose
Ki-67	Kernprotein, Proliferationsmarker
LENT-SOMA	Late Effects of Normal Tissues/ Subjective, Objective, Management and Analytic Categories
LPS	Lipopolysaccharide
MASCC	Multinational Association of Supportive Care in Cancer
Mg ²⁺	Magnesium
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
MW	Mittelwert

NCI	National Cancer Institute
nSMase	neutrale Sphingomyelinase
OMAS	Oral Mukositis Assessment Scale
p53	Tumorsuppressor-Protein
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PEG	perkutane endoskopische Gastrostomie
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RKI	Robert Koch Institut
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Radiotherapie
RTOG/EORTG	Radiation Therapy Oncology Group/ European Organisation for Research and Treatment of Cancer
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SEM	standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
SF	surviving fraction ("Überlebensrate")
SMase	Sphingomyelinase
SPF	spezifiziert pathogenfrei
TBS	Tris Buffered Saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
TNM	Klassifikationssystem von Tumoren
WHO	World Health Organisation
3D-CRT	Three-dimensional conformal radiotherapy (dreidimensionale konforme Strahlentherapie)

1 Einleitung

Maligne Tumoren sind in den Industrieländern derzeit nach Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Bösartige Neubildungen waren 2014 in Deutschland ursächlich für 25,8 % aller Todesfälle, 38,9 % gingen auf Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zurück (Statistisches Bundesamt, 2016). Mit jährlich rund 17500 Fällen standen im Jahr 2014 Kopf-Hals-Tumoren in Deutschland an siebenter Stelle aller Tumorneudiagnosen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei 65 Jahren, die 5-Jahres-Überlebensrate im Mittel war 61 % (Frauen) bzw. 51 % (Männer) (RKI, 2016). Ätiologisch sind Nikotin- und Alkoholkonsum für die Erkrankung an Kopf-Hals-Tumoren die bedeutendsten Risikofaktoren (Lewin, et al., 1998; Maier, et al., 1992; Parkin, et al., 2005). In den letzten Jahren wurde auch zunehmend die Rolle einer HPV-Infektion für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren diskutiert (Betiol, et al., 2013; Marur, et al., 2010; McKaig, et al., 1998; Rautava, et al., 2012; Syrjänen, 2005).

Bei der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren ist die Strahlentherapie neben der Chirurgie und Chemotherapie von tragender Bedeutung. Ziel einer kurativen Therapie ist die vollständige Tumorkontrolle, welche mit steigender Strahlendosis zunimmt (Lee, et al., 2003; Miah, et al., 2012; Thames, et al., 1992). Die Applikation der optimalen Dosis auf das Tumorgewebe schließt immer auch eine Exposition gesunden Gewebes innerhalb (z.B. Gefäße) und am Rand des Tumors, sowie in den Ein- und Austrittskanälen der Strahlung ein; mit einem gewissen Risiko der Entstehung von Nebenwirkungen (Dörr, 2009b; Herrmann, et al., 2006). Diese Strahlenfolgen an den Normalgeweben können als frühe Strahlenreaktionen (Erstdiagnose bis zu 90 Tage nach Beginn der Bestrahlung) oder als chronische Strahleneffekte auftreten (Monate bis Jahre nach Bestrahlung) (Dörr, 2009b; Herrmann, et al., 2006).

Eine häufige und dosislimitierende Nebenwirkung der Strahlentherapie von Kopf-Hals-Tumoren ist die radiogene *Mucositis enoralis* (Dörr, 2009b; Dörr, et al., 2007; Trotti, et al., 2003). Im Verlauf der Radiotherapie ist bei nahezu allen Patienten eine orale Mukositis zu beobachten (Trotti, et al., 2003). Ein Teil der Patienten muss aufgrund von Schmerzen und der damit verbundenen eingeschränkten Nahrungsaufnahme die Behandlung unterbrechen, bis die Schleimhautläsionen ausgeheilt sind. Dies führt zu einer Verlängerung der Behandlungszeit und somit einer Reduktion der Tumorheilungswahrscheinlichkeit (Ferreira, et al., 2015; Herrmann, et al., 1994; Robertson, et al., 1998; Russo, et al., 2008). Je nach Schweregrad der oralen Mukositis sind Hospitalisierung, eine künstliche Ernährung und die Gabe von Schmerzmitteln für den Patienten notwendig. Dies wiederum führt zu erhöhten Kosten im Gesundheitswesen (Elting, et al., 2007; Murphy, 2007; Murphy, et al., 2009).

Die radiogene orale Mukositis manifestiert sich ab Anfang der zweiten Behandlungswoche während einer konventionell fraktionierten Bestrahlung mit 5 x 2 Gy/Woche. Symptome sind

eine Rötung und Schwellung im bestrahlten Bereich. Diese können wenige Tage später in fokale Erosionen, im weiteren Verlauf in konfluente Läsionen übergehen, welche von einer Pseudomembran bedeckt sind (Dörr, et al., 2008; Dörr, et al., 2005).

Je nach Schweregrad und Dauer dieser frühen Strahlenreaktion der Mundschleimhaut können sich im weiteren Verlauf chronische Strahlenfolgen im bestrahlten Gewebe entwickeln, welche auch als konsekutive Spätfolgen bezeichnet werden (Dörr, 2009c; Dörr und Hendry, 2001; Herrmann, et al., 2006). Eine effektive Prophylaxe bzw. Behandlung der Frühreaktion würde damit auch das Ausmaß konsekutiver Spätfolgen und deren Behandlung minimieren. Neben rein symptomatischen Behandlungen gibt es derzeit keine allgemein anerkannte Prophylaxe oder biologisch basierte Therapie der radiogenen Mukositis (Dörr, 2009a; Dörr und Herskind, 2012).

Die *Mucositis enoralis* ist die Folge einer strahlenbedingten Reduktion der Zellproduktion in der Mundschleimhaut. Inwiefern apoptotische Prozesse im Epithel, aber vor allem auch in den Endothelien der zugehörigen Gefäße, an der Ausprägung von frühen Strahlenfolgen der Schleimhäute beteiligt sind, wird derzeit kontrovers diskutiert (Brown, 2008; Coderre, 2008; Gudkov und Gleiberman, 2008; Hendry, 2008; Paris, et al., 2001).

In diesem Zusammenhang spielt die Ceramid-vermittelte Apoptose eine mögliche Rolle (Hwang, et al., 2005; Sonis, 2004). Ceramide, die chemisch zur Gruppe der Sphingolipide gehören, sind Bestandteile der Zellmembran. Als „second messenger“ aktivieren Ceramide eine Reihe von Signalkaskaden, welche apoptotische Prozesse induzieren können (Kolesnick und Fuks, 2003; Mullen, et al., 2011; Pettus, et al., 2002; Yabu, et al., 2015). Die Generierung von Ceramiden erfolgt sowohl durch Neusynthese mittels Ceramid-Synthase als auch durch die hydrolytische Spaltung von Sphingomyelin durch Sphingomyelinasen (SMasen).

Das Tripeptid Glutathion ist ein spezifischer Inhibitor der neutralen Sphingomyelinase (Liu und Hannun, 1997). Hwang et al. zeigten, dass die Inhibition der neutralen Sphingomyelinase durch Glutathion im Schleimhautepithel der Hamster-Backentasche nach Einzeitbestrahlung (40 Gy) zu einer verminderten Expression von Ceramiden führte (Hwang, et al., 2005).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss einer Glutathionbehandlung auf die Ausprägung der strahleninduzierten *Mucositis enoralis* nach Einzeit- und täglich fraktionierter Bestrahlung über eine bzw. zwei Wochen im Tiermodell der Mäusezunge zu untersuchen. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen erfassen begleitend qualitative und quantitative Veränderungen der Morphologie und der Proteinexpression im Zungenepithel. Die Ergebnisse sollen die Bedeutung (Ceramid-vermittelter) apoptotischer Prozesse für die klinische Manifestation der strahleninduzierten oralen Mukositis klären.

2 Literaturübersicht

2.1 Kopf-Hals-Tumoren

2.1.1 Epidemiologie

Zu den Kopf-Hals-Tumoren zählen maligne Erkrankungen der Mundhöhle, der Lippe, des Nasopharynx, des Oropharynx, des Larynx, des Hypopharynx und der Speicheldrüsen (Guntinas-Lichius, et al., 2010). Tumoren dieser Entitäten stehen weltweit an sechster Stelle aller Tumorneuerkrankungen (Argiris, et al., 2008; Kamangar, et al., 2006). Bei über 90 % dieser Tumoren handelt es sich histologisch um Plattenepithelkarzinome, lediglich im Bereich der Speicheldrüsen überwiegen Adenokarzinome (RKI, 2013; Seeber und Schütte, 2007).

Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Kopf-Hals-Tumors gehören Alkohol- und Tabakkonsum (Lewin, et al., 1998; Maier, et al., 1992; Parkin, et al., 2005). Es wird vermutet, dass mehr als 80 % aller Kopf-Hals-Tumoren darauf zurück zu führen sind (Seeber und Schütte, 2007). Auch der Genuss von Kautabak und/oder Marihuana (Wang, 1992), eine unzureichende Mundhygiene (Rosenquist, et al., 2005), langfristige mechanische Irritationen der Mundschleimhaut durch schlecht sitzenden Zahnersatz sowie die berufliche Exposition mit Holzstäuben (Bertz, et al., 2010) werden mit einem höheren Erkrankungsrisiko in Verbindung gebracht. Bei der Entstehung alkohol- und tabakunabhängiger Tumoren wird zunehmend die Rolle einer HPV-Infektion diskutiert (Betiol, et al., 2013; Marur, et al., 2010; McKaig, et al., 1998; Rautava, et al., 2012; Syrjänen, 2005). Bis zu 70 % der jüngeren Patienten (< 50 Jahre) mit oropharyngealen Tumoren weisen eine Infektion mit humanen Papillomaviren (HPV) auf (Curado und Hashibe, 2009). Diese Tumoren haben möglicherweise eine günstigere Prognose durch eine höhere Strahlensensitivität (GEKID, 2012; Kimple, et al., 2013). Eine weitere Assoziation besteht möglicherweise zwischen Karzinomen des Nasopharynx und einer Infektion mit Epstein-Barr-Virus (EBV). Bei Patienten mit nasopharyngealen Karzinomen wurden höhere Titer für Antikörper gegen Epstein-Barr-Viren nachgewiesen als bei Patienten mit anderen malignen Erkrankungen im HNO-Bereich (Henle und Henle, 1976).

In Deutschland erkrankten 2014 12992 Männer und 4532 Frauen an einem Malignom im Kopf-Hals-Bereich (RKI, 2016). Männer erkrankten im Durchschnitt mit 64 Jahren, Frauen mit 66 Jahren (RKI, 2016). Die Diagnose erfolgt bei Frauen häufiger in einem früheren Stadium als bei Männern, wodurch sich eine bessere Prognose bei Frauen ergibt (RKI, 2015). Dies spiegelt sich in der höheren 5-Jahres-Überlebensrate von Frauen (61 %) im Vergleich zu Männern (51 %) wider (RKI, 2016). Bis 2030 wird aufgrund der demographischen Entwicklung in Deutschland eine Zunahme von Neoplasien im Kopf-Hals-Bereich um 6 % (gegenüber den Fallzahlen von 2010) prognostiziert (Pritzkeleit, et al., 2010).

Die Einteilung von Tumoren erfolgt üblicherweise mittels der TNM-Klassifikation (**T**umor-**N**ode-**M**etastases) in Abhängigkeit der Ausdehnung des Primärtumors (T), des regionären Lymphknotenbefalls (N) und einer eventuell vorliegenden Fernmetastasierung (M). Tab. 1 gibt eine Übersicht der TNM-Klassifikation von Kopf-Hals-Tumoren (Barnes, 2005), (Wittekind, 2014).

Tab. 1: TNM-Klassifikation von Kopf-Hals-Tumoren (Lippe, Mundhöhle) (Wittekind, 2014)

Primärtumor	
T1	≤ 2 cm
T2	> 2 bis 4 cm
T3	> 4 cm
T4a	<i>Lippe</i> : Infiltration des kortikalen Knochens, N. alveolaris inferior, Mundboden, Haut
	<i>Mundhöhle</i> : Infiltration des kortikalen Knochens, äußeren Muskulatur der Zunge, Kieferhöhle, Haut
T4b	Infiltration des Spatium masticatorium, Processus pterygoideus, Schädelbasis, A. carotis interna
Regionäre Lymphknoten	
N1	einzelne Lymphknotenmetastase ≤ 3 cm auf der gleichen Seite
N2a	einzelne Lymphknotenmetastase > 3 - 6 cm auf der gleichen Seite
N2b	mehrere Lymphknotenmetastasen ≤ 6 cm auf der gleichen Seite
N2c	Lymphknotenmetastase ≤ 6 cm auf beiden Seiten oder Gegenseite
N3	Lymphknotenmetastase > 6 cm
Fernmetastasen	
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

2.1.2 Therapie von Kopf-Hals-Tumoren

Die Therapie von Kopf-Hals-Tumoren basiert auf chirurgischer Resektion, Strahlentherapie und Chemotherapie (Richter und Feyerabend, 1996). Diese können sowohl alleine als auch in Kombination eingesetzt werden. Bei der Wahl des Behandlungskonzepts werden dabei Größe, Ausdehnung und Lokalisation des Tumors, histologischer Status, Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie individuelle Patienten-Charakteristika (z.B. Allgemeinzustand, Begleiterkrankungen) berücksichtigt (Wendt, et al., 2010). Die kurative Therapie maligner Erkrankungen hat die vollständige Heilung des Patienten zum Ziel. Bei fortgeschrittener Erkrankung kann oft nur palliativ behandelt werden, d.h. mit dem Ziel einer Verbesserung der Lebensqualität durch Linderung von Schmerzen.

2.1.2.1 Chirurgische Therapie

Die Operation von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren erfolgt meist primär und mit dem Ziel der vollständigen Entfernung des Tumors (R0-Resektion), einschließlich lokaler regionärer Lymphknotenmetastasen (Bootz, et al., 2008). Eine unvollständige Resektion mit mikro- oder

makroskopischen Tumorresten wird als R1- bzw. R2-Resektion bezeichnet. Die Entfernung verschiedener Lymphknotengruppen („neck dissection“) ist abhängig von Anzahl, Größe und Lokalisation der Lymphknoten und Lage des Primärtumors (Bootz, et al., 2008). Wurden keine Lymphknotenmetastasen diagnostiziert, können die Lymphknoten entlang des typischen Metastasierungsweges des Primärtumors vorsorglich entfernt werden („elective neck dissection“) oder es erfolgt eine Bestrahlung des regionären Lymphabflussgebietes im Rahmen einer adjuvanten Radiotherapie (Bootz, et al., 2008).

2.1.2.2 Strahlentherapie

Fast zwei Drittel der Patienten mit Tumorerkrankungen erhalten im Verlauf ihrer Erkrankung eine Strahlentherapie (ASTRO, 2014). Die Bestrahlung erfolgt meist als perkutane Radiotherapie. Sie wird häufig als konformale Bestrahlung in Form einer Vielfelder-3-D-Radiotherapie (3DRT) oder einer intensitätsmodulierten Radiotherapie (IMRT) durchgeführt. Dies erlaubt eine im Vergleich zur 2D-Radiotherapie verbesserte Schonung von Risikoorganen (Laban, et al., 2012; Wendt, et al., 2010). Alternativ kann in geeigneten Fällen eine Brachytherapie durchgeführt werden (Wendt, et al., 2010). Bei dieser Form der Radiotherapie wird eine umschlossene Strahlenquelle in unmittelbarer Nähe zum Tumor gebracht. Dies kann durch die Applikation der Strahlenquellen in einer Körperhöhle (intrakavitär) oder durch eine Implantation im Gewebe (interstitiell) erfolgen (Fritz, et al., 2013). Bei Kombination mit der perkutanen Radiotherapie erfolgt durch die interstitielle Brachytherapie eine zusätzliche lokale Dosiserhöhung (Boost) (Bootz, et al., 2008), welche die Tumorkontrollwahrscheinlichkeit erhöht und aufgrund der gezielten Applikation schonender für das umgebende Normalgewebe ist.

In Kombination mit einer chirurgischen Tumoresektion kann die Strahlentherapie entweder präoperativ (neoadjuvant) oder postoperativ (adjuvant) angewendet werden (Wannenmacher, et al., 2013). Ziele einer präoperativen Strahlentherapie sind die Verkleinerung primär inoperabler Tumoren, damit auch ein verbesserter Funktionserhalt der betroffenen Organe bei der nachfolgenden Operation und eine Erhöhung der Tumorkontrollwahrscheinlichkeit durch Abtötung von Tumorzellen in den regionären Lymphabflussgebieten des Tumors (Wannenmacher, et al., 2013). Die wichtigsten Behandlungskonzepte bei der Therapie von Kopf-Hals-Tumoren sind die adjuvante und die definitive (alleinige) Radiotherapie (Wendt, et al., 2010). Die adjuvante Strahlentherapie verringert das Risiko eines Lokalrezidivs durch Bestrahlung verbliebener Tumorreste und Mikrometastasen im Operationsgebiet oder in den Lymphabflussgebieten (Wannenmacher, et al., 2013). Dieses Behandlungskonzept wird vor allem nach unvollständiger Tumoresektion (R1-, R2- Resektion), bei Tumorf infiltration des angrenzenden Gewebes, bei Lymphknotenmetastasen > 3 cm, Lymphknotenkapselruptur und bei Lymphgefäßinvasion

durchgeführt. Die definitive Radiotherapie, bzw. simultan in Verbindung mit einer Chemotherapie, ist bei fortgeschrittenen, inoperablen Tumoren indiziert (Bootz, et al., 2008). Die Anzahl an Fraktionen, Dosis pro Fraktion, Gesamtdosis und Gesamtdauer einer Strahlentherapie werden in Abhängigkeit von Tumorklassifikation und Allgemeinzustand des Patienten verordnet. Die in der Strahlentherapie wesentlichen Bestrahlungsprotokolle sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Übersicht der wichtigsten Parameter unkonventioneller Fraktionierungsprotokolle (Dörr et al. 1996)

Protokoll	Dosis pro Fraktion [Gy]	Fraktionen pro Woche	Wochen-dosis	Gesamt-dosis*	Gesamt-dauer*
konventionell	1,8 - 2,0	5	9 - 10		
hyperfraktioniert	1,0 - 1,2	↑	< 12	↑	=
akzeleriert	1,8 - 2,0	↑	> 12	= / ↓	↓
akzeleriert-hypofraktioniert	1,0 - 1,6	↑	> 12	= / ↓	↓
hypofraktioniert	> 3,0	variabel	variabel	↓	↓

* im Vergleich zur konventionellen Bestrahlung

Konventionelle Fraktionierung

Das Standardprotokoll einer konventionell fraktionierten Strahlentherapie für Plattenepithelkarzinome umfasst eine Gesamtdosis von etwa 60 bis 70 Gy über einen Zeitraum von 6 bis 7 Wochen. Die wöchentliche Dosis (5 Fraktionen) beträgt 9 bis 10 Gy, appliziert in 5 täglichen Dosen von 1,8 bis 2,0 Gy. Die Gesamtdosis ist abhängig von der Tumorentität, Tumorgröße und Lokalisation (Dörr, et al., 1996a; Herrmann, et al., 2006). Ausgehend von diesem Standardprotokoll wurde eine Vielzahl modifizierter Behandlungsprotokolle eingeführt, die im Folgenden näher erläutert werden.

Hyperfraktionierung

Durch eine Aufteilung der Gesamtdosis in eine höhere Anzahl an Fraktionen mit einer geringeren Dosis pro Fraktion (1,0 bis 1,6 Gy) als bei der konventionellen Therapie wird bei gleich bleibender Gesamtbehandlungszeit und Gesamtdosis eine höhere Toleranz vor allem spät reagierender Normalgewebe erreicht (Dörr, et al., 1996a). Die bevorzugte Schonung der Normalgewebe beruht auf deren besseren Erholungskapazität (Baumann und Gregoire, 2009; Herrmann, et al., 2006). In der Praxis wird eine Steigerung der Dosis pro Woche mit einer Gesamtdosiserhöhung um 15 % bis 20 % angestrebt („dosiseskalierte Hyperfraktionierung“), die reine Hyperfraktionierung findet dagegen kaum klinische Anwendung. In randomisierten klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine dosiserhöhte hyperfraktionierte Strahlentherapie im Vergleich zur konventionellen Fraktionierung zu einer verbesserten lokoregionären Kontrolle von Kopf-Hals-Tumoren führt

(Bourhis, et al., 2006). Allerdings resultiert die Erhöhung der Gesamtdosis auch in einer Zunahme früher Strahlenreaktionen wie der oralen Mukositis (Bensadoun, et al., 2001).

Akzelerierte Fraktionierung

Als akzelerierte Fraktionierung wird die Verkürzung der Gesamtbehandlungszeit unter Beibehaltung der konventionellen Dosis von 1,8 bis 2,0 Gy pro Fraktion bezeichnet (Herrmann, et al., 2006). Aufgrund einer erhöhten Anzahl der Fraktionen pro Woche, die durch Verabreichung von mehreren Fraktionen pro Tag oder von zusätzlichen Fraktionen am Wochenende erreicht wird, beträgt die Dosis pro Woche mehr als 12 Gy. Der Vorteil einer akzelerierten Fraktionierung gegenüber der konventionellen Fraktionierung ist die Verbesserung der Tumorkontrollrate, was wahrscheinlich durch eine geringere Regeneration („Repopulierung“, siehe 2.7.3) klonogener Tumorzellen bedingt ist (Baumann und Gregoire, 2009). Da dieses Behandlungsschema aber auch die Regenerationsfähigkeit der früh reagierenden Normalgewebe vermindert, werden häufiger Nebenwirkungen vor allem an den Schleimhäuten beobachtet (Dische, et al., 1997; Dörr, 2009c; Horiot, et al., 1997). Die frühe Schleimhautreaktion ist deshalb häufig ein limitierender Faktor für eine standardisierte klinische Anwendung (Dörr, et al., 1996b).

Eine Modifikation der akzelerierten Fraktionierung ist die begleitende Boost-Bestrahlung. Während einer konventionell fraktionierten Behandlung wird in den letzten 2 bis 2,5 Wochen der Therapie täglich eine zusätzliche Strahlendosis auf ein kleineres Zielvolumen appliziert (Ang, et al., 1990; Fu, et al., 2000; Knee, et al., 1985).

Akzelerierte Hyperfraktionierung

Bei der Kombination von akzelerierter und hyperfraktionierter Bestrahlung wird die Dosis pro Fraktion gegenüber der konventionellen Fraktionierung verringert (1,0 Gy bis 1,6 Gy). Gleichzeitig wird die wöchentliche Dosis durch die Gabe von bis zu 3 Fraktionen am Tag erhöht (Dörr, et al., 1996a). Dabei kann der Patient von den Vorteilen sowohl einer hyperfraktionierten Bestrahlung als auch einer akzelerierten Fraktionierung profitieren. Um das Risiko für frühe Nebenwirkungen zu senken, wird bei einer akzelerierten Hyperfraktionierung meist die Gesamtdosis etwas reduziert (Wang, 1988).

Eine extreme Form der akzelerierten Hyperfraktionierung ist das CHART-Protokoll (**c**ontinuous **h**yperfractionated **a**ccelerated **r**adiotherapy). Dies beinhaltet die Applikation einer Gesamtdosis von 54 Gy in 3 täglichen Fraktionen an 12 aufeinander folgenden Tagen (Dische und Saunders, 1990). Die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren nach dem CHART-Protokoll zeigt ein vermehrtes Auftreten radiogener Mukositiden der Mundschleimhaut (Dische, et al., 1997).

Hypofraktionierung

Die Bestrahlung mit Fraktionsdosen von 2,0 Gy bis 3,0 Gy wird als Hypofraktionierung bezeichnet. Die Gesamtdosis und die Anzahl der Fraktionen sind im Vergleich zur konventionellen Fraktionierung häufig geringer, um das Risiko für Spätfolgen durch die hohen Dosen pro Fraktion zu reduzieren. Dieses Behandlungskonzept findet vor allem in der palliativen Strahlentherapie Anwendung (Dörr, et al., 1996a). Hierbei erfolgt zum Beispiel die Applikation von Einzelbestrahlungen mit 8 Gy, 5 x 4-5 Gy oder 10 x 3 Gy während einer Behandlungszeit von ein bis zwei Wochen (Herrmann, et al., 2006).

Die moderate Hypofraktionierung findet Anwendung bei der Therapie von Prostata- und Mammakarzinomen sowie Melanomen und Liposarkomen, welche eine hohe Erholungskapazität besitzen (Baumann und Gregoire, 2009).

2.1.2.3 Chemotherapie

Eine weitere Option zur Behandlung von Tumorerkrankungen ist die Chemotherapie. Sie wirkt systemisch, wodurch auch Fernmetastasen erreicht werden (Barth, 2010; Gencer, 2013). Die alleinige Chemotherapie führt nur in Ausnahmen zur Heilung solider Tumoren, weshalb sie nahezu ausschließlich palliativ bei fehlenden lokalen Therapiemöglichkeiten angewendet wird (Bootz, et al., 2008). Kurativ erfolgt sie häufig in Verbindung mit einer Radiotherapie und/oder chirurgischen Resektion. Vorteil einer kombinierten Radiochemotherapie ist die additive Tumorzellabtötung. Die Chemotherapie kann zeitlich versetzt zu einer Radiatio (sequenziell) oder begleitend (simultan) appliziert werden (Molls, 2013). Bei der Behandlung von nichtmetastasierten Kopf-Hals-Tumoren zeigte die simultane Radiochemotherapie eine Verbesserung des Gesamtüberlebens gegenüber der induktiven Chemotherapie (Pignon, et al., 2000; Pignon, et al., 2009). Die Kombination einer akzelerierten hyperfraktionierten Strahlentherapie mit einer simultanen Chemotherapie führt gegenüber der alleinigen Strahlentherapie ebenfalls zu einer höheren lokoregionären Kontrolle (Budach, et al., 2005).

Chemotherapeutika wirken proliferationshemmend und töten vor allem aktiv proliferierende Zellen ab. Davon sind jedoch neben den malignen Tumorzellen auch Zellen der Umsatzgewebe betroffen (z.B. Knochenmark, Schleimhäute des oberen und unteren Gastrointestinaltrakts, Epidermis). Die zusätzliche Chemotherapie führt zu einer Verstärkung der frühen strahlentherapiebedingten Nebenwirkungen (Mukositis, Dermatitis) (Calais, et al., 1999; Staar, et al., 2001; Wendt, et al., 1998).

Bei der kombinierten Radiochemotherapie von Kopf-Hals Tumoren werden häufig 5-Fluoro-Uracil (5-FU), cis-Diamin-Dichlor-Platin (cDDP), Carboplatin oder Mitomycin C (MMC), allein oder in Kombination, eingesetzt (Budach, et al., 2006; Wendt, et al., 2010).

2.2 Strahlenreaktionen der Normalgewebe

2.2.1 Frühe Strahlenreaktionen

Strahlenfolgen, die erstmalig bis zum Tag 90 nach Bestrahlungsbeginn auftreten, werden als frühe (akute) Strahlenreaktionen bezeichnet (Dörr, 2009b; Perez und Brady, 1993a; Perez und Brady, 1993b). Sie sind charakteristisch für Umsatzgewebe, wie das Epithel der Haut und der Schleimhäute sowie das Knochenmark (Dörr, 2009b; Herrmann, et al., 2006). In diesen Geweben wird durch ständige Zellneubildung ein permanenter physiologischer Zellverlust im Rahmen eines genau eingestellten Gleichgewichts (steady state) ausgeglichen (Herrmann, et al., 2006).

Charakteristisch für Umsatzgewebe ist die hierarchische Organisation der Proliferation, von der Gewebstammzelle über begrenzt teilungsfähige Transitzellen bis zur reifen, postmitotischen Funktionszelle (Dörr, 2009b; Herrmann, et al., 2006). Durch mechanische Einflüsse an der Oberfläche des Epithels werden ständig differenzierte Funktionszellen abgeschilfert. Stammzellen teilen sich asymmetrisch in zwei verschiedene Tochterzellen, wobei eine Zelle als Stammzelle erhalten bleibt und die andere Zelle nach einer begrenzten Anzahl von Teilungen („Transitteilungen“) in die Differenzierung übergeht. Daraus resultiert eine erhöhte Ausbeute an Zellen pro Stammzellteilung (Dörr, 2009b).

Die Pathogenese früher Strahlenfolgen beruht auf dem Verlust der Teilungsfähigkeit der Stammzellen. Dadurch kommt es zu einem eingeschränkten Nachschub in die funktionelle Zellschicht. Bei gleich bleibender physiologischer Rate von Zelldifferenzierung und Zellverlust resultiert daraus eine progressive Verminderung funktioneller Zellen (Hypoplasie), die letztendlich zum Funktionsverlust des Gewebes führt (Dörr, 2009b). Der Zeitraum zwischen Strahlenexposition und klinischer Manifestation der Strahlenfolgen ist die Latenzzeit, welche von der gewebespezifischen Umsatzzeit abhängig ist. Die Latenzzeit ist über weite Dosisbereiche unabhängig von der applizierten Dosis (Dörr, 2009b; Herrmann, et al., 2006).

Frühe Strahlenreaktionen sind in der Regel reversibel. Der mit zunehmender Dosis einhergehende erhöhte Verlust von Zellen wird durch überlebende Zellen im Bestrahlungsfeld und einwandernde, proliferationsfähige Zellen aus unbestrahlten Gewebeanteilen kompensiert (Dörr, 2009b; Dörr, 2010). Sowohl die Intensität der Strahlenreaktion als auch die Dauer der Regeneration sind abhängig von der Strahlendosis (Dörr, 2009b; Dörr und Herrmann, 2009; Herrmann, et al., 2006).

Die der frühen Strahlenreaktion von Schleimhäuten zugrunde liegenden molekularen Pathomechanismen sind noch unklar (Dörr, 2010). Durch die Strahlenexposition werden reaktive Sauerstoffspezies generiert, welche die DNA direkt oder indirekt schädigen (Dörr, et al., 2007). Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. NFκB, AP-1) induziert die Modulation verschiedener Signalkaskaden. Darin eingebunden sind Signalmoleküle wie z.B.

Interleukine, Wachstumsfaktoren, Sphingomyelinasen und Caspasen (Dörr, 2010; Dörr, et al., 2007). In Endothelzellen und Makrophagen wurde ein Anstieg proinflammatorischer Zytokine wie z.B. Interleukin-1a (IL-1a), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) oder Cyclooxygenase-2 (COX-2) beobachtet (Dörr, 2009b; Sonis, 2004). Die Bedeutung der einzelnen Signalmoleküle und -ketten, sowie eine mögliche Beteiligung apoptotischer Prozesse bei der Entstehung früher Strahlenreaktionen sind derzeit ungeklärt und werden kontrovers diskutiert (Brown, 2008; Coderre, 2008; Gudkov und Gleiberman, 2008; Hendry, 2008; Paris, et al., 2001).

2.2.2 Chronische Strahlenreaktionen

Per definitionem handelt es sich bei Strahlenreaktionen, die erstmalig ab 90 Tagen nach Bestrahlungsbeginn diagnostiziert werden, um späte (chronische) Strahlenreaktionen (Perez und Brady, 1993b). Sie treten meist Monate bis Jahre nach einer Strahlentherapie auf und sind im Gegensatz zu frühen Strahlenreaktionen in der Regel nicht reversibel. Die Latenzzeiten sind invers abhängig von der Dosis. Das Ausmaß der klinischen Manifestation nimmt mit steigender Dosis zu (Dörr, 2009b).

An der komplexen Pathogenese später Strahlenreaktionen sind das Organparenchym, das Bindegewebe, sowie das Kapillar- und Immunsystem beteiligt (Dörr, 2009b; Dörr, 2010; Herrmann, et al., 2006). Im Organparenchym manifestiert sich durch die dosisabhängige Abtötung von Zellen eine Parenchymatrophie (Dörr, 2010). Durch die Strahlenexposition von proliferationsfähigen Fibroblasten im Bindegewebe wird die Differenzierung zu postmitotischen Fibrozyten induziert, was mit einer massiven Zunahme der Kollagensynthese verbunden ist (Rodemann und Bamberg, 1995). Die Strahlenreaktion der Fibroblasten wird wesentlich durch TGF- β (Transforming Growth Factor- β) moduliert (Hakenjos, et al., 2000). Die daraus resultierende Strahlenfibrose ist mit einem Funktionsverlust des betroffenen Gewebes verbunden.

Die Bestrahlung des Gefäßsystems führt zu einer Schädigung der Endothelzellen, welche zu einer progressiven Abnahme der Kapillardichte führt. In Folge der Unterversorgung des abhängigen Gewebes trägt die reduzierte Kapillardichte zur Entstehung der Gewebsatrophie bei (Dörr, 2009b). Weiterhin können Teleangiektasien auftreten, deren Pathogenese unklar ist. Von klinischer Relevanz sind diese massiv erweiterten Kapillaren aufgrund ihrer erhöhten Blutungsneigung sowie der eingeschränkten Funktionalität (Dörr, 2009b; Dörr, 2010).

2.2.3 Konsekutive Strahlenreaktionen

Eine Sonderform von Strahlenfolgen stellen die konsekutiven Strahlenreaktionen dar. Das Ausmaß einer Frühreaktion in einem Gewebe/Organ kann dabei die Manifestation der chronischen Veränderung in diesem Organ beeinflussen (Herrmann, et al., 2006). Die Schutzfunktion von z.B. Epithelien gegenüber chemischen und mechanischen Noxen wird durch die frühe Strahlenreaktion beeinträchtigt. Dies kann zu einer zusätzlichen Schädigung der Zielstrukturen der chronischen Strahlenreaktion (Gefäße, Bindegewebe) führen. Konsekutive Strahlenreaktionen treten vor allem in Darm, Harnblase, Lunge, Mundschleimhaut und an besonders beanspruchten Lokalisationen der Haut auf (Dörr und Herskind, 2012). Hinsichtlich ihrer strahlenbiologischen Eigenschaften verhalten sich konsekutive Strahlenreaktionen wie frühe Strahlenreaktionen (siehe 2.7), d.h. sie zeigen einen geringen Fraktionierungseffekt und eine starke Abhängigkeit von der Gesamtbehandlungszeit (Dörr, 2009c; Herrmann, et al., 2006).

2.2.4 Klassifikationssysteme für Nebenwirkungen der Strahlentherapie

Es existieren mehrere standardisierte Klassifikationssysteme zur Dokumentation der Normalgewebsreaktionen in der onkologischen Therapie (Seegenschmiedt, 2013). Sie erfassen die Toxizität verschiedener Bestrahlungsprotokolle und die Wirksamkeit von Maßnahmen zur Prophylaxe und Therapie der Nebenwirkungen. Allen gängigen Klassifikationssystemen ist die Einteilung in sechs Schweregrade gemeinsam: Grad 0 kennzeichnet das Fehlen von Symptomen, Grad 4 beschreibt die maximale Ausprägung von Therapiefolgen und Grad 5 steht für den durch die Nebenwirkungen bedingten Tod des Patienten (Dörr, et al., 2009).

Die bedeutendsten Klassifikationssysteme sind:

- CTCAE v4.03 (Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 4.03) des NCI (National Cancer Institute)
- WHO-Klassifikation (World Health Organisation)
- RTOG/EORTC-Klassifikation (Radiation Therapy Oncology Group/European Organisation for Research and Treatment of Cancer)
- Dische-Klassifikation für chronische Strahlenfolgen
- LENT/SOMA System (Late Effects of Normal Tissues/Subjective, Objective, Management and Analytic Categories) (Seegenschmiedt, 2013)

Eine detaillierte Darstellung der Klassifikation der radiogenen *Mucositis enoralis* findet sich in Kapitel 2.3.3.

2.3 Strahlenreaktion der Mundschleimhaut

2.3.1 Klinische Bedeutung

Die radiogene *Mucositis enoralis* ist eine schwerwiegende, dosislimitierende Nebenwirkung der Radio(chemo)-therapie von Kopf-Hals-Tumoren. Zwischen 89 % bis 100 % der Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren entwickeln während der Strahlentherapie eine orale Mukositis in verschiedenen Schweregraden (Trotti, et al., 2003). Die Ausprägung und der Schweregrad sind abhängig von der Größe des Bestrahlungsfeldes, der applizierten Dosis, der Fraktionierung und dem simultanen Einsatz von Chemotherapeutika (Bensadoun, et al., 2001; Elting, et al., 2007).

Die äußerst schmerzhaften Schleimhautläsionen führen zu einer enormen Beeinträchtigung der Lebensqualität und des Allgemeinzustandes des Patienten (Armstrong und McCaffrey, 2006; Dörr, et al., 2008). Es treten Beschwerden beim Sprechen, Schlucken und Kauen auf, in deren Folge es zu einem relevanten Gewichtsverlust des Patienten kommen kann. Um dies zu vermeiden, muss der Patient gegebenenfalls mittels eines perkutanen endoskopischen Gastrostoma (PEG) ernährt werden (Dörr, et al., 2007; Dörr, et al., 2008; Trotti, et al., 2003). Bei schweren Formen der radiogenen Mukositis wird nicht selten die Strahlentherapie unterbrochen, bis die Läsionen ausgeheilt sind. Eine ungeplante Therapieunterbrechung führt jedoch zu einer schlechteren lokalen Tumorkontrolle (Ferreira, et al., 2015; Herrmann, et al., 1994; Robertson, et al., 1998; Russo, et al., 2008). Die klinische Manifestation einer radiogenen Mukositis kann durch Bestrahlungspausen und eine längere Gesamtbehandlungszeit vermindert werden. Dies birgt allerdings die Gefahr einer verminderten Tumorkontrollrate (Withers, et al., 1995).

Dauer und Schweregrad der Mukositis haben zusätzlich Einfluss auf die Entstehung konsekutiver Spätfolgen in der Mundhöhle, wie z.B. chronische Schleimhautatrophien, Ulzerationen, Ödeme, Fibrosen und Osteoradionekrosen (siehe 2.2.3) (Dörr, 2010; Dörr und Hendry, 2001; Dörr, et al., 2008; Feyer, 2006).

Die eingeschränkte Barrierefunktion der geschädigten Schleimhäute begünstigt das Eindringen von Bakterien. Die Folge können lokale und systemische Infektionen bis hin zu lebensbedrohlichen Septikämien durch Eintritt von Erregern in die Blutbahn sein (Dörr, et al., 2008).

Die Behandlung einer *Mucositis enoralis* und ihrer Komplikationen hat auch eine signifikante sozioökonomische Bedeutung (Peterman, et al., 2000). In den USA wird von Kosten zwischen 1700 und 6000 \$ pro Patient in Abhängigkeit vom Schweregrad ausgegangen (Elting, et al., 2007; Lalla und Keefe, 2011). Die Größenordnung dieser Kosten ist auf europäische Gesundheitssysteme übertragbar (Dörr, et al., 2008).

2.3.2 Klinischer Verlauf der radiogenen Mucositis enoralis

Das klinische Bild einer konfluenten radiogenen *Mucositis enoralis* zeigt exemplarisch Abb. 1.

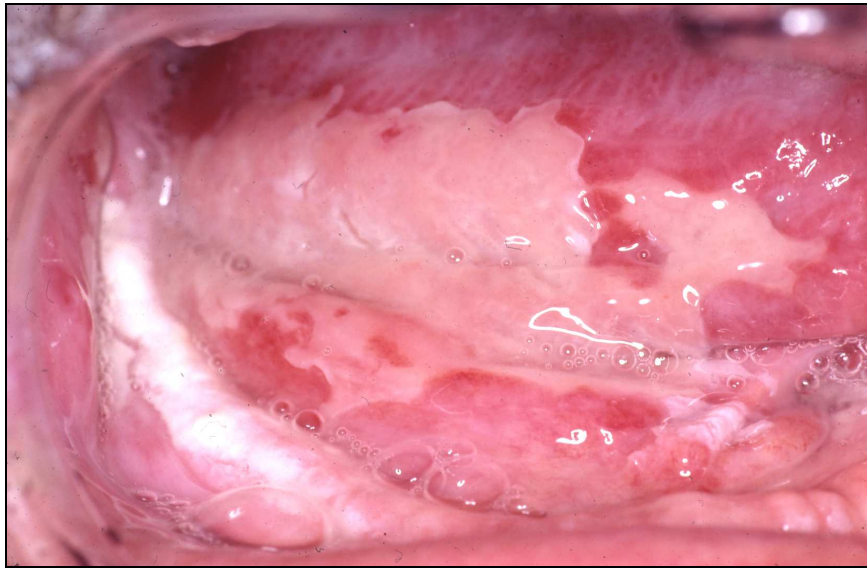


Abb. 1: Klinisches Bild einer konfluenten *Mucositis enoralis*

Die Abbildung zeigt eine konfluente Läsion der Mundschleimhaut, welche von einem weißlichen Fibrinbelag bedeckt ist. Im Randbereich der Ulzerationen sind Entzündungsreaktionen sichtbar (Foto: Dörr, mit Erlaubnis).

Die frühe Strahlenreaktion der Mundschleimhaut basiert auf der Interaktion verschiedener Zellpopulationen, wie Epithelzellen, Fibroblasten, Endothelzellen der Kapillaren und Makrophagen (Dörr, et al., 2007). Die epitheliale Strahlenreaktion folgt den Grundsätzen der allgemeinen Pathogenese früher Strahlenfolgen (siehe 2.2.1). Die Sterilisation von epithelialen Stammzellen durch Strahlenexposition führt zu einer fortschreitenden Hypoplasie des Gewebes. Fehlt der Ersatz für die durch mechanische Beanspruchung abgeschilften differenzierten Epithelzellen, kommt es zu einer epithelialen Hypoplasie bis hin zum vollständigen Verlust des Epithels. Das zeitliche Auftreten einer derartigen Ulzeration ist abhängig von der Umsatzzeit des Gewebes (Herrmann, et al., 2006).

Der klinische Verlauf der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut wird in vier Stadien unterteilt: die initiale vaskuläre Phase, die epitheliale Phase, die ulzerativ-bakterielle Phase und die Heilungsphase (Dörr, et al., 2007; Dörr, et al., 2008; Dörr und Riesenbeck, 2000; Sonis, 2011). Zu Beginn der zweiten Bestrahlungswoche (5 x 2 Gy/Woche) können Erytheme und Ödeme der Mundschleimhaut auftreten, welche durch eine Kapillarerweiterung und Veränderungen der Gefäßpermeabilität in der Submukosa hervorgerufen werden. In dieser Phase treten bereits Schmerzen und Schluckstörungen auf. Während der zweiten bis dritten Bestrahlungswoche verstärken sich diese Symptome; es bilden sich fokale Schleimhautläsionen, welche von Fibrin und Zellresten bedeckt werden. In der dritten bis vierten Woche gehen diese in konfluente Ulzerationen über (Dörr, et al., 2007;

Dörr, et al., 2009; Dörr, et al., 2008; Dörr und Riesenbeck, 2000; Sonis, 2011). Die maximale Ausprägung der radiogenen *Mucositis enoralis* wird in der vierten bis fünften Woche erreicht. Die vollständige Heilung ist in der Regel innerhalb von vier bis sechs Wochen nach Therapieende abgeschlossen (Dörr, et al., 2005; Elting, et al., 2007).

Der Schweregrad einer radiogenen *Mucositis enoralis* ist abhängig von verschiedenen Faktoren, z.B. dem Bestrahlungsprotokoll, einer zusätzlichen Chemotherapie, dem Ernährungs- und Allgemeinzustand des Patienten, der Mundhygiene und möglicherweise einer genetischen Veranlagung (Barasch und Peterson, 2003; Cawley und Benson, 2005; Dörr, et al., 2008; Sonis, 2013; Vera-Llonch, et al., 2006).

2.3.3 Dokumentation/Klassifizierung der radiogenen oralen Mukositis

Für die Graduierung der radiogenen oralen Mukositis sind der Schweregrad, die klinischen Symptome, die Fähigkeit zur Aufnahme fester und flüssiger Nahrung und das subjektive Befinden des Patienten von Bedeutung (Sonis, 2011). Verschiedene Scoringsysteme wurden bereits unter 2.2.4 aufgelistet. Im klinischen Alltag wird heute häufig das RTOG/EORTC-System (Tab. 3) eingesetzt (Herrmann, et al., 2006; Mallick, et al., 2015).

Tab. 3: RTOG/EORTC- Klassifikation der frühen Nebenwirkungen der Strahlentherapie an der Mundschleimhaut (nach Seegenschmiedt 1998)

Grad	Kriterium
0	keine Veränderung
1 "leicht"	mildes Erythem, Beläge, geringe Schmerzen, keine Analgetika nötig
2 "deutlich"	fleckförmige, mäßig schmerzende Mukositis, blutige Beläge, Analgetika erforderlich
3 "ausgeprägt"	konfluierende, fibrinöse Mukositis, starke Schmerzen, Narkotika erforderlich
4 "lebensbedrohlich"	Blutungen, Ulzerationen, Nekrosen, ggf. parenterale Ernährung nötig
5 " Tod des Patienten durch Nebenwirkungen"	Tod

Eine Modifizierung des RTOG/EORTC-Systems nach Maciejewski et al. (Maciejewski, et al., 1991) zeigt Tab. 4. Dieses System beinhaltet die räumliche Ausdehnung der Mukositis, beruht aber zudem auf einer veränderten Definition der einzelnen Schweregrade. Dies erfordert für die Veröffentlichung klinischer Ergebnisse zwingend eine Angabe des verwendeten Klassifikationssystems, um Verwechslungen vorzubeugen (Riesenbeck und Dörr, 1998).

Tab. 4: Modifizierte RTOG/EORTC-Klassifikation für die radiogene orale Mukositis (nach Maciejewski et al. 1991)

Grad	Kriterium	Ausdehnung der bestrahlten Mundschleimhaut
0	keine Reaktion	-
1	mildes Erythem	< 50%
1,5	mildes Erythem	> 50%
2	starkes fokales Erythem	< 50%
2,5	starkes konfluierendes Erythem	> 50%
3	fokale Mukositis	< 50%
3,5	fokale Mukositis	> 50%
4	konfluierende Mukositis	< 50%
4,5	konfluierende Mukositis	> 50%

Weitere etablierte Klassifizierungssysteme der strahleninduzierten Nebenwirkungen sind die Common Terminology Criteria for Adverse Events in der gegenwärtigen Version 4.03 (NCI, 2010) und das WHO-System (WHO, 1979). Beide Systeme orientieren sich wesentlich am Grad der Beeinträchtigung der Nahrungsaufnahme. Anzumerken ist, dass in beiden Systemen die Einteilung in Früh- und Späteffekte entfällt (Herrmann, et al., 2006). Eine Gegenüberstellung dieser Klassifikationssysteme zeigt Tab. 5.

Tab. 5: Klassifikationssysteme der WHO und CTC für die radiogene orale Mukositis (NCI, 2010; WHO, 1979)

Grad	WHO	CTC
	Kriterium	
0	keine Veränderung	keine Veränderung
1	Entzündung, Rötung	asymptomatische oder leichte Symptome, keine Indikation zur Intervention
2	Erythem, Ulzeration, feste Nahrung möglich	mäßige Schmerzen, keine Beeinträchtigung der Nahrungsaufnahme, weiche modifizierte Diät
3	Ulzeration, nur flüssige Nahrungsaufnahme möglich	starke Schmerzen, Beeinträchtigung der Nahrungsaufnahme
4	Ulzeration, orale Nahrungsaufnahme nicht möglich	lebensbedrohliche Konsequenzen, Notfallintervention indiziert
5	Tod	Tod

Ein sehr detailliertes System zur Dokumentation der radiogenen *Mucositis enoralis* wurde 1988 von Dische entwickelt (Dische, 1988) und von Riesenbeck und Dörr 1998 (Riesenbeck und Dörr, 1998) veröffentlicht (Tab. 6). Zusätzlich zu den morphologischen Kriterien wird in diesem System Gewicht auf die subjektiven Beschwerden der Patienten gelegt (Riesenbeck und Dörr, 1998). Neben obligaten Kriterien können hierbei auch fakultative Parameter einbezogen werden. Die Klassifikation nach Dische ist gut für klinische Studien zur Prävention und Therapie der oralen Mukositis geeignet, allerdings ist der Einsatz für den klinischen Alltag zu zeitaufwendig (Riesenbeck und Dörr, 1998).

Ein weiteres Klassifizierungssystem für orale Nebenwirkungen der onkologischen Therapie ist OMAS (**O**ral **M**ucositis **A**ssessment **S**cale), welches Veränderungen an neun definierten Bereichen in der Mundhöhle erfasst (Sonis, et al., 1999). Vorteil dieses Klassifizierungssystems ist eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Begutachtern und die hohe Korrelation zwischen objektiven Mukositiszeichen und dem subjektiven Empfinden der Patienten (Sonis, et al., 1999). Für die Dokumentation der Nebenwirkungen in einer lokalen Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich ist die OMAS-Klassifizierung allerdings nicht geeignet, da *a priori* festgelegte Positionen in der Mundhöhle beurteilt werden, unabhängig davon, ob sie bestrahlt wurden (Dörr, et al., 2009; Dörr, et al., 2008).

Tab. 6: Dische-Klassifikation der Nebenwirkungen an der Mundschleimhaut (modifiziert nach Riesenbeck und Dörr 1998)

Obligate Bewertungskriterien	Bewertung
Schluckschmerzen	0 - keine; 1 - leicht; 2 - mäßig; 3 - schwer
Schluckstörungen	0 - keine
	1 - leichte Schluckbeschwerden
	2 - erschwertes Schlucken
	3 - stark erschwertes Schlucken, nur flüssige Nahrung
	4 - sehr starke Beschwerden beim Schlucken flüssiger Nahrung
Erythem	0 - kein Erythem; 1 - leicht; 2 - mäßig; 3 - stark
Mukositis-Verteilung	0 - keine Mukositis; 1 - fleckig; 2 - konfluierend
Ulzeration	0 - keine
	1 - oberflächlich
	2 - tiefe Gewebeanteile betroffen
	3 - Knochen betroffen
	4 - Fistel
Fakultative Bewertungskriterien	Bewertung
Mukositisfläche	0 - 100% der bestrahlten Schleimhaut
Membrantyp der Mukositis	0 - ohne Membran
	1 - dünn, opaleszierend
	2 - mittel
	3 - dick
Ödem	0 - kein Ödem; 1 - leicht; 2 - mäßig; 3 - stark
Grad der Dehydrierung	0 - keine; 1 - leicht; 2 - mäßig; 3 - stark
Grad der Intervention	0 - keine
	1 - Magensonde
	2 - intravenöse Flüssigkeitszufuhr
	3 - intravenöse Ernährung
	4 - andere
Atrophie der Mukosa	0 - keine; 1 - leicht; 2 - mäßig; 3 - stark
Blässe der Mukosa	0 - keine; 1 - leicht; 2 - mäßig; 3 - stark
Teleangiectasien	0 - keine; 1 < 1 cm ² ; 2 - 1 - 4cm ² ; 3 > 4 cm ²
Schleimhautulzerationen	0 - 100% der bestrahlten Schleimhaut
Tiefe der Ulzeration	0 - 100% der bestrahlten Schleimhaut
Zusätzliche Nekrose	0 - 100% der bestrahlten Schleimhaut
Geschmacksbeeinträchtigung	0 - keine; 1 - teilweise; 2 - vollständig
Verlorene Behandlungstage aufgrund der Mundschleimhautreaktion	xx Tage
Mundtrockenheit	0 - keine; 1 - leicht; 2 - mäßig; 3 - stark

2.3.4 Prophylaxe und Therapie der radiogenen oralen Mukositis

In der Literatur finden sich viele Ansätze zur Prophylaxe und Therapie der radiogenen *Mucositis enoralis*. Ein allgemein gültiges Konzept für die klinische Routine wurde bisher jedoch nicht etabliert. Neuere Übersichten finden sich in u.a. in folgenden Publikationen: (Barasch und Epstein, 2011; Dörr, 2009a; Jensen, et al., 2013; Lalla und Keefe, 2011; Nicolatou-Galitis, et al., 2013; Peterson, et al., 2015). Zudem existieren Empfehlungen der Fachgesellschaften, wie die Leitlinien der **Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie** (DEGRO, 2015), die Leitlinien der **Deutschen Krebsgesellschaft** (DKG, 2012) oder der **Multinational Association for Supportive Care in Cancer** und der **International Society of Oral Oncology** (MASCC/ISOO) (Lalla, et al., 2014). Die folgenden Abschnitte geben eine Übersicht zu Ansätzen in der Therapie und Prävention der radiogenen *Mucositis enoralis*.

2.3.4.1 Allgemeine Maßnahmen

Durch intensive Patientenaufklärung soll der Patient dazu angehalten werden, während der Strahlentherapie auf Nikotin, Alkohol, scharfe, saure, sehr heiße und sehr kalte Speisen und Getränke zu verzichten. Scharfkantige Nahrung kann die Mundschleimhaut ebenso irritieren (Dörr, et al., 2007; Dörr, et al., 2008; Richter und Feyerabend, 2002). Zahnprothesen sollten während und bis zu sechs Monate nach der Strahlentherapie nicht getragen werden, um Epitheldefekte durch Druckstellen zu vermeiden (Dörr, et al., 2008).

Im Rahmen der Therapieplanung muss darauf geachtet werden, dass nur eine möglichst kleine Schleimhautfläche bestrahlt wird (Dörr, et al., 2007; Dörr, et al., 2008). Metallhaltige Dentallegierungen können zu lokalen Dosisspitzen an der Mukosa von bis zu 170 % führen, wodurch eine vermehrte Mukositis induziert wird (Dörr, et al., 2007; Dörr, et al., 2008; Reitemeier, et al., 2002). Diese zusätzliche Strahlenexposition sollte unbedingt durch den Einsatz von Schleimhautretraktoren („Abstandsschienen“) während der Bestrahlung vermieden werden (Dörr, et al., 2007; Dörr, et al., 2005).

Eine ausreichende Nahrungsaufnahme des Patienten während der Therapie muss gewährleistet werden. Ist die orale Nahrungsaufnahme infolge schmerzhafter Ulzerationen nicht möglich, kann das Anlegen eines perkutanen endoskopischen Gastrostomas in Betracht gezogen werden (Dörr, et al., 1997; Dörr, et al., 2007; Rosenthal und Trotti, 2009). Bei Schmerzen durch bestehende Schleimhautläsionen muss eine adäquate Schmerzbehandlung zu Einsatz kommen, gegebenenfalls auch systemisch (Barasch, et al., 2006; Dörr, et al., 2007; Dörr, et al., 2008).

Nicht zu unterschätzen ist die Bedeutung der persönlichen Betreuung der Patienten durch Ärzte, Pflegepersonal und Familienangehörige. Die intensive Fürsorge ist unerlässlich für die Compliance und das Allgemeinbefinden des Patienten und führt zu einer signifikanten

Senkung des Bedarfs an Schmerzmitteln (Janjan, et al., 1992; Richter und Feyerabend, 2002).

2.3.4.2 Zahnsanierung

Vor Beginn einer Strahlentherapie ist eine gründliche Zahnsanierung, unter strenger Indikation zum Zahnerhalt, unerlässlich (Dörr, et al., 2008; Eberle und Grötz, 2013; Feyer, 2006; Raber-Durlacher, et al., 2010). Dies beinhaltet die Resektion avitaler, kariös zerstörter oder teilretinierter Zähne, die Entfernung aller weichen und harten Beläge und eine konservierende Therapie am Restzahnbestand. Durch die Glättung scharfer Kanten an den Zähnen oder am Zahnersatz und das Abtragen scharfer Knochenkanten wird die Integrität der Schleimhaut während und nach der Bestrahlung erhalten (Feyer, 2006). Bereits zahnlose Patienten sollten röntgenologisch untersucht werden, um enossale Befunde, wie z.B. verlagerte Zähne, Osteolysen, Zysten und Wurzelreste zu erkennen (Dörr, et al., 2008).

Die Fluoridierung mittels einer Fluoridierungsschiene zum Schutz vor Karies sollte bereits vor Beginn der Strahlentherapie eingeleitet werden und ist auch nach der Bestrahlung konsequent weiterzuführen (Dörr, et al., 2008; Rosenthal und Trotti, 2009).

2.3.4.3 Mundspülungen

Regelmäßige Mundspülungen können die Inzidenz einer Mukositis deutlich reduzieren (Dörr, et al., 2008). Dabei stehen der Spülvorgang und die damit verbundene Reinigung der Mundhöhle im Vordergrund; die Inhaltsstoffe der Spüllösungen sind von untergeordneter Bedeutung (Dörr, et al., 2007; Dörr, et al., 2008). Wichtig sind dagegen die Häufigkeit, Regelmäßigkeit und Intensität der Spülungen (Dörr, et al., 2007; Dörr, et al., 2008; Dörr, et al., 2005). Die Wirksamkeit von Mundspülungen mit Wasser, physiologischer Kochsalzlösung oder Salbeisud ist vergleichbar mit derjenigen industrieller Spüllösungen (Bepanthen, Polyvidon-Jod) (Dörr, et al., 2008; Feyer, 2006).

2.3.4.4 Antibiose

Die in Verbindung mit einer Radiotherapie im Kopf-Hals-Bereich relativ häufig auftretende *Candida albicans*-Infektion (Soorostomatitis) wird mit Nystatin, Amphotericin B oder Fluconazol lokal in Form von Lutschtabletten behandelt, bzw. als Suspension bei bestehender Xerostomie (Dörr, et al., 2008; Grötz, 2003). Eine gezielte Antibiose bei symptomatischen bakteriellen Infektionen sollte erst nach einer Bestimmung des Keim- und Resistenzspektrums durchgeführt werden. Diese Maßnahmen sind rein symptomatisch, eine prophylaktische Applikation ist nicht zu empfehlen (Dörr, et al., 2007).

2.3.4.5 Modulation der Entzündung

Das nichtsteroidale Medikament Benzydamin wirkt analgetisch, anästhetisch, antiinflammatorisch und antiseptisch und hat sich in der Prophylaxe der *Mucositis enoralis* bewährt (Dörr, et al., 2007; Epstein, 2002; Epstein, et al., 2001; Kazemian, et al., 2009; Turnbull, 1995). Die positive Wirkung wurde in mehreren kontrollierten Studien nachgewiesen (Epstein, et al., 1989; Kim, et al., 1986; Prada, et al., 1984). Seitens der MASCC/ISOO wird Benzydamin zur Prävention der oralen Mucositis bei alleiniger Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich mit Gesamtdosen bis 50 Gy empfohlen (Lalla, et al., 2014). Der unangenehme Geschmack beeinträchtigt jedoch die Compliance der Patienten (Dörr, et al., 2007).

Die Daten zu Wirksamkeit und Nutzen von Corticosteroiden und weiteren nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAID) im Rahmen einer Strahlentherapie sind widersprüchlich (Nicolatou-Galitis, et al., 2013). Die immunsuppressive Wirkung fördert die mikrobielle Besiedlung (z.B. Soor), wodurch eine zusätzliche Antibiotikagabe erforderlich sein kann (Dörr, et al., 1997).

2.3.4.6 Biologische Konditionierung

Die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren wirkt sich positiv auf die Zellproliferation aus. Der rekombinante humane Keratinozyten-Wachstumsfaktor (rHu-KGF, Palifermin, Kevivance®) wurde bereits in verschiedenen klinischen Studien getestet und die signifikante Reduktion des Auftretens einer schweren oralen Mukositis nachgewiesen (Brizel, et al., 2008; Raber-Durlacher, et al., 2013). Der Keratinozyten-Wachstumsfaktor gehört zur Familie der Heparin-bindenden Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (Finch, et al., 1989). Er induziert im Epithel eine Steigerung der Zellneubildung und moduliert Migrations- und Differenzierungsvorgängen (Dörr, 2003; Dörr, et al., 2001; Dörr, et al., 2002b) sowie Entzündungsprozesse (Jaal, et al., 2010). Bei Applikation von KGF vor Manifestation der Ulzerationen konnte im Tierexperiment eine Verminderung der oralen Mukositis beobachtet werden (Dörr, et al., 2002c). In klinischen Studien wurde nachgewiesen, dass die Gabe von rHu-KGF reduzierend auf die Dauer und Schwere einer Mukositis nach Ganzkörperbestrahlung vor Stammzelltransplantation wirkt (Peterson, et al., 2011; Sonis, 2011).

2.3.4.7 Reduktion freier Sauerstoffradikale

Amifostin ist ein Radikalfänger, dessen Wirkung hinsichtlich der oralen Mukositis in Studien bisher widersprüchliche Ergebnisse erbrachte (Nicolatou-Galitis, et al., 2013). Metaanalysen zeigten eine positive Wirkung hinsichtlich der oralen Mukositis (Sasse, et al., 2006; Stokman,

et al., 2006). Allerdings konnte dieser Effekt in anderen größeren Studien nicht bestätigt werden, oder es trat sogar ein negativer Effekt auf (Buentzel, et al., 2006).

Selen vermindert die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im bestrahlten Gewebe durch Aktivierung oder Stimulation der Glutathion-Peroxidase. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die systemische oder topische Gabe von Selen zu einer signifikanten Reduktion der durch fraktionierte Bestrahlung induzierten *Mucositis enoralis* führt. Es wird vermutet, dass der Wirkung von Selen andere Mechanismen als die Modulation der ROS zugrunde liegen, da die Wirksamkeit stark abhängig vom Applikationszeitpunkt ist (Gehrisch und Dörr, 2007).

Das Enzym Superoxid-Dismutase schützt Zellen vor der negativen Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies. In verschiedenen präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit rekombinanter Mangan-Superoxid-Dismutase zu einem Schutz von Normalgeweben vor Strahlenschäden führt (Borrelli, et al., 2009; Greenberger und Epperly, 2007).

2.3.4.8 Weitere klinische Maßnahmen

Die Kälteapplikation, im radioonkologischen Sprachgebrauch auch als **Kryotherapie** bezeichnet, besteht aus dem Lutschen von Eistabletten, wobei Wasser, Salbeisud oder auch andere Lösungen zur Eisherstellung verwendet werden können. Die Eiswürfel dürfen nicht zu kalt und scharfkantig sein, um die Schleimhaut nicht zu verletzen. Die mukoprotektive Wirkung der Kryotherapie beruht auf einer lokalen Vasokonstriktion, welche zu einer temporären Sauerstoffunterversorgung des Gewebes führt. Dies führt zu einer reduzierten Strahlensensitivität der Schleimhaut (Dörr, et al., 2007). Die lokale Kühlung vermindert zudem Schmerzzustände (Dörr, et al., 2008).

Die chemische oder mechanische Ablation oberflächlicher Gewebsschichten fördert die **Stimulation der Proliferation** des Schleimhautepithels (Dörr, 1997a). Die lokale Anwendung eines milden Adstringens, wie z.B. Silbernitratlösung, zeigte einen positiven Einfluss in Verbindung mit akzelerierter Bestrahlung (Maciejewski, et al., 1991); jedoch konnte bei konventionell fraktionierter Bestrahlung keine signifikante Verminderung der radiogenen *Mucositis enoralis* durch Silbernitratbehandlung beobachtet werden (Dörr, et al., 1995). Eine weitere Möglichkeit zur Stimulierung der Zellproliferation ist die Abtragung von oberflächlichen Schleimhautschichten durch Laserbehandlung. Es konnte in verschiedenen randomisierten, Placebo-kontrollierten Studien gezeigt werden, dass die Ausprägung der oralen Mukositis und der damit verbundenen Schmerzen signifikant gesenkt wird (Bensadoun und Nair, 2012; Bjordal, et al., 2011; Carroll, et al., 2015; Oberoi, et al., 2014; Oton-Leite, et al., 2013).

2.4 Weitere Nebenwirkungen der Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich

Neben der radiogenen *Mucositis enoralis* kann die Strahlentherapie von Kopf-Hals-Tumoren zu weiteren Effekten an Normalgeweben führen. Zu den frühen Folgen zählen Mundtrockenheit (Xerostomie) und Geschmacksveränderungen. Später können sich Schleimhautatrophie und -ulzerationen, Strahlenkaries, dauerhafte Radioxerostomie, Geschmacksbeeinträchtigungen, Kieferklemme (Trismus) oder eine sekundär infizierte Osteoradionekrose manifestieren (Dörr, et al., 2008; Dörr, et al., 2005). In den nachfolgenden Abschnitten wird auf die häufigsten Nebenwirkungen näher eingegangen.

2.4.1 Geschmacksveränderungen

Die Beeinträchtigung des Geschmacksinnes während einer Strahlentherapie ist ab einer Schwellendosis von ca. 30 Gy zu beobachten (Herrmann, et al., 2006). Das Ausmaß der Schädigung der Geschmacksknospen korreliert dabei eng mit Strahlendosis, Fraktionierung, Größe des bestrahlten Zungenvolumens und Bestrahlungstechnik (Dörr, et al., 2008; Kamprad, et al., 2008; Redda und Allis, 2006). Neben der direkten radiogenen Schädigung der Geschmackspapillen wird der Geschmackssinn zusätzlich durch die radiogene Xerostomie und die orale Mukositis eingeschränkt (Herrmann, et al., 2006). Zuerst wird meist eine Verminderung der Geschmacksqualitäten „bitter“ und „salzig“ wahrgenommen, im späteren Verlauf ist auch die Geschmacksqualität „süß“ betroffen (Dörr, et al., 2008; Herrmann, et al., 2006; Redda und Allis, 2006). Eine maximale Beeinträchtigung des Geschmackssinnes tritt ab der dritten und vierten Behandlungswoche auf und besteht bis zum Ende der Strahlentherapie fort (Dörr, et al., 2008). Nach dem Ende der Strahlentherapie kommt es zu einer Erholung des Geschmacksempfindens, wobei jedoch die Schwellenwerte für die Empfindlichkeiten der verschiedenen Geschmacksqualitäten erhöht bleiben (Dörr, et al., 2008). Durch Verlagerung der Zunge aus dem Hochdosisbereich mittels entsprechender Lagerungshilfen kann das Ausmaß einer Geschmacksstörung reduziert werden (Dörr, et al., 2008).

2.4.2 Radiogene Xerostomie

Eine frühe Nebenwirkung der Strahlentherapie bei Kopf-Hals-Tumoren ist die Xerostomie (Mundtrockenheit), welche bereits während der Behandlung beginnt und häufig in einen chronischen Verlauf übergeht (Dörr, et al., 2008; Guchelaar, et al., 1997). Speicheldrüsen weisen eine hohe Strahlenempfindlichkeit auf; bereits ab Dosen von 10 Gy nimmt der Speichelfluss ab; schmerzhafte Entzündungszustände können auftreten (Herrmann, et al., 2006). Durch die bevorzugte Schädigung der strahlenempfindlicheren serösen Drüsenanteile nimmt die Viskosität des Speichels initial zu, bei höheren Dosen werden auch die muzinösen

Anteile geschädigt (Dörr, et al., 2008). Zu einem irreversiblen Funktionsausfall der Speicheldrüsen führen Strahlendosen über 25 Gy (Herrmann, et al., 2006). Histologisch ist anfänglich eine Atrophie der serösen Drüsenanteile mit ausgeprägter Entzündungsreaktion nachweisbar. Im chronischen Verlauf kommt es infolge von Umbauprozessen des Bindegewebes zu einer irreversiblen interstitiellen Fibrose (Dörr, et al., 2008; Dörr, et al., 2005).

Die Xerostomie führt zu Beeinträchtigungen beim Sprechen, Kauen, Schmecken und Schlucken und verursacht orale Schmerzen. Sie ist zudem verbunden mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Strahlenkaries, orale Infektionen und Dysphagie (Sciubba und Goldenberg, 2006).

Zur Prophylaxe der radiogenen Xerostomie dient der Ausschluss möglichst großer Teile der Speicheldrüsen aus dem Hochdosisvolumen (Herrmann, et al., 2006) mittels IMRT (Mancini, et al., 2013).

Bei einsetzender Xerostomie ist die Stimulation des Speichelflusses durch zuckerfreie, nicht kariogene Bonbons oder Kaugummi und eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr essentiell (Feyer, 2006). Zur Entfernung des zähen Speichels werden häufige Mundspülungen empfohlen (Dörr, et al., 2008; Feyer, 2006). Bei schwerer Xerostomie können **Carboxymethylcellulose-** (CMC), Polyethylenoxid- oder Muzin- und Lysozym-haltige Mittel als Speichelersatz verwendet werden. Diese Ersatzstoffe erfüllen jedoch nicht alle Funktionen des Speichels und fördern zum Teil die Demineralisierung der Zahnhartsubstanz (Kielbassa und Meyer-Lueckel, 2001).

Bei einer Restfunktion der Speicheldrüsen kann die Anwendung des speichelanregenden Parasympatikomimetikums Pilocarbin zu einer Verminderung der Mundtrockenheit eingesetzt werden (Greenspan und Daniels, 1987; Horiot, et al., 2000), wobei aber mögliche Nebenwirkungen in Form von vermehrten Schwitzen, Harndrang, Rhinitis und Kopfschmerzen zu beachten sind (Dörr, et al., 2008). Die prophylaktische Gabe von Cumarin/ Troxerutin (Grötz, et al., 2001) und Amifostin (Bohuslavizki, et al., 1999; Radvansky, et al., 2013) kann die Intensität und Dauer der radiogenen Xerostomie reduzieren. Da eine mögliche tumorprotektive Wirkung von Amifostin nicht auszuschließen ist, wird derzeit eine Anwendung nur im Rahmen von Studien zu empfohlen (Feyer, 2006).

2.4.3 Strahlenkaries

Die Strahlenkaries ist eine häufige, sich relativ frühzeitig in einen chronischen Verlauf manifestierende Nebenwirkung der Strahlentherapie bei Erwachsenen (Dörr, 2009b). Sie ist für etwa die Hälfte aller infizierten Osteoradionekrosen (siehe 2.4.4) im Kieferbereich verantwortlich (Schweyen, et al., 2012). Die Toleranzgrenze der Zähne von 15 bis 20 Gy wird bei einer Bestrahlung im Kopf-Hals-Bereich in der Regel deutlich überschritten. Die

Mindestlatenzzeit beträgt sechs bis sieben Monate nach Ende der Strahlentherapie (Dörr, et al., 2008).

An der Entstehung einer Strahlenkaries sind zwei Pathomechanismen beteiligt: die direkte Wirkung der Strahlung auf die Zahnhartsubstanz und die indirekte Wirkung durch Veränderung des oralen Milieus durch z.B. Xerostomie (siehe 2.4.2) und veränderte Nahrungsgewohnheiten in Folge der Geschmacksstörungen (Dörr, et al., 2008; Herrmann, et al., 2006). Die Zahnhartsubstanz wird vor allem an der Schmelz-Dentin-Grenze durch Bestrahlung geschädigt. Die Retraktion der Odontoblastenfortsätze im Dentin geht auf die radiogene Schädigung der Pulpa zurück (Dörr, et al., 2008). Die radiogene Xerostomie trägt durch Veränderung der Elektrolytzusammensetzung des Speichels und einem erniedrigten pH-Wert zu einer Demineralisierung des Zahnschmelzes bei (Kielbassa, et al., 2006).

Vor Beginn einer Strahlentherapie ist deshalb eine gründliche Zahnsanierung erforderlich. Unterstützend sollte bereits vor der Therapie mit einer Fluoridierung der Zähne begonnen und diese dann möglichst lebenslang fortgesetzt werden (Dörr, et al., 2008; Feyer, 2006; Grötz, 2003). Die Patienten einer Kopf-Hals-Bestrahlung müssen langfristig betreut werden, da radiogene Veränderungen der Zähne über lange Zeitintervalle schmerzfrei sind; so kann ohne zielgerichtete Therapie innerhalb von wenigen Monaten ein rasch fortschreitender Zerfall der Zahnkrone eintreten (Dörr, et al., 2008).

2.4.4 Infizierte Osteoradionekrose (IORN)

Die schwerwiegendste Nebenwirkung der Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich ist die Osteoradionekrose. Sie tritt nach Monaten bis Jahren in Abhängigkeit von der Bestrahlungstechnik mit einer Inzidenz von 5 % bis 25 % auf (Dörr, et al., 2008). Die Inzidenz der Osteoradionekrose korreliert signifikant mit chirurgischen Eingriffen am Unterkiefer vor einer Strahlentherapie (Monnier, et al., 2009). Einen weiteren wesentlichen Einfluss auf die Entstehung einer Osteoradionekrose haben die applizierte Strahlendosis, das exponierte Knochenvolumen, ein schlechter Zahnstatus, Prothesendruckstellen und Zahnextraktionen nach Strahlentherapie (Dörr, et al., 2008; Kluth, et al., 1988; Peterson, et al., 2010). Die komplexe Pathogenese wird sowohl durch die direkte radiogene Schädigung des Knochens als auch durch die strahleninduzierten Gefäßveränderungen bestimmt (Dörr, et al., 2008). Im Gewebe manifestieren sich Hypoxie, Hypovaskularität und Hypozellularität (Marx, 1983). Als ein wesentlicher Mechanismus bei der Entstehung einer IORN gilt die strahleninduzierte Fibrose (Delanian und Lefaix, 2004; Frerich, 2013; Lambade, et al., 2013). Der Unterkiefer ist häufiger von radiogenen Nekrosen betroffen, da er eine höhere Knochendichte und eine schlechtere Blutversorgung aufweist (Scully und Epstein, 1996). Das klinische Bild einer Osteoradionekrose variiert von asymptomatischen Stellen im betroffenen Knochen bis hin zu schmerzhaften, eitrigen Nekrosen mit freiliegenden Knochen

ohne Sekundärheilung (Dörr, et al., 2008; Sciubba und Goldenberg, 2006). Häufig sind diese mit Fistelbildung zur Haut oder Schleimhaut assoziiert. Osteolysen führen zu Frakturen und Kieferteilverlusten (Dörr, et al., 2008).

Prophylaktisch sollten Zahnsanierungen vor einer Strahlentherapie erfolgen (siehe auch 2.3.4.2) und freiliegende Knochenabschnitte mit Schleimhaut gedeckt werden (Dörr, et al., 2008). Zahnextraktionen und chirurgische Eingriffe am Kiefer nach Strahlentherapie sollten nur mit entsprechendem Infektionsschutz an ausgewiesenen Zentren durchgeführt werden (Dörr, et al., 2008). Die konservative Therapie einer Osteoradionekrose umfasst Antibiotikagabe, Débridement und Spülungen (Dörr, et al., 2008). Die Behandlung mit hyperbaren Sauerstoff zeigte bislang ambivalente Ergebnisse; ein positiver Effekt konnte nur bei kleineren Läsionen nachgewiesen werden (Frerich, 2013). Eine chirurgische Resektion ist in fortgeschrittenen Stadien oftmals unumgänglich (Dörr, et al., 2008).

2.4.5 Trismus

Bei bis zu der Hälfte der Patienten mit einer Strahlentherapie im Kopf-Hals-Bereich tritt eine Behinderung der Mundöffnung (Kieferklemme, Trismus) auf (Dijkstra, et al., 2004). Vor allem Bestrahlungen des Kiefergelenks oder des Kaumuskels sind mit einem Trismus assoziiert (Bensadoun, et al., 2010), wobei das Behandlungsregime von untergeordneter Rolle zu sein scheint (Kent, et al., 2008). Die funktionelle Einschränkung der Beweglichkeit des Kiefergelenkes wird unter anderem durch die Schädigung und Fibrosierung der Kaumuskeln verursacht (Sciubba und Goldenberg, 2006). Die Ausprägung des Trismus zeigt eine Abhängigkeit von der Strahlendosis (Teguh, et al., 2008). Durch die beeinträchtigte Mundöffnung wird die Lebensqualität des Patienten infolge erschwelter Nahrungsaufnahme und Behinderungen beim Sprechen erheblich reduziert. Zusätzlich werden die Aufrechterhaltung der Mundhygiene und zahnärztliche Untersuchungen eingeschränkt (Dörr, et al., 2008). Für eine erfolgreiche Therapie ist es wichtig, bereits bei einem signifikanten Risiko bzw. beginnendem Trismus mit Übungen zum Erhalt der Fähigkeit zur Mundöffnung zu beginnen (Dörr, et al., 2008). Ein bereits klinisch manifester, ausgeprägter Trismus ist operativ nur mit mäßigem Erfolg behandelbar und weist eine hohe Rezidivneigung auf (Dörr, et al., 2008).

2.5 Aufbau und proliferative Organisation der Mundschleimhaut

2.5.1 Allgemeine Anatomie und Histologie der Mundhöhle

Die Mundhöhle wird in drei Teile getrennt: den Mundvorhof (Vestibulum oris) zwischen Lippen und Zahnreihe, die eigentliche Mundhöhle (Cavum oris) und der Übergangszone zwischen Mundhöhle und Pharynx (Isthmus faucium). Das Cavum oris wird kranial von dem

knöchernen Gaumen (Palatum durum) begrenzt und ist kaudal offen mit der Rachenhöhle verbunden. Weitere Begrenzungen sind der muskulöse Mundboden, die Zunge (Lingua) und die Backen (Vestibulum bucca) (Schünke, et al., 2012).

Die Zunge wird anatomisch in Zungenspitze (Apex linguae), Zungenkörper (Corpus linguae) und Zungenwurzel (Radix linguae) unterteilt. Eine oberflächliche Längsfurche (Sulcus medianae) teilt die Zunge median. Über das Zungenbändchen (Frenulum linguae) ist die Zunge mit dem Mundhöhlenboden verbunden (Schünke, et al., 2012). Die Schleimhaut der Mundhöhle wird von einem mehrschichtigen, teilweise verhornenden Plattenepithel ausgekleidet, welches der Basalmembran und der bindegewebigen Lamina propria aufliegt.

2.5.2 Humane Mundschleimhaut

2.5.2.1 Aufbau

Die humane Mundschleimhaut wird von einem mehrschichtigen Plattenepithel gebildet, welches nur an mechanisch beanspruchten Stellen (Gaumen, Gingiva) eine Keratinisierung aufweist. Das Plattenepithel sitzt der Basalmembran und der bindegewebigen Lamina propria auf, welche auch Immunzellen enthält. Strukturell und funktionell wird die Mundschleimhaut in die mastikatorische, die auskleidende und die spezialisierte Mukosa eingeteilt (Lüllmann-Rauch, 2006). Die mastikatorische Schleimhaut befindet sich am harten Gaumen und an der Gingiva. Der weiche Gaumen, die Wangen, die Lippen, der Mundboden, die Zungenunterseite und das Vestibulum werden von der auskleidenden Schleimhaut bedeckt, welche unverhornt ist. Die spezialisierte Schleimhaut bedeckt die Zungenoberseite (Zungenrücken) und die Zungenspitze; sie gewährleistet Geschmacks-, Tast- und Temperaturwahrnehmung durch sensorische und mechanische Papillen (Lüllmann-Rauch, 2006). Das Epithel der Zungenunterseite ist papillenfrie. Funktionell dient die Mundschleimhaut dem Schutz vor äußeren mechanischen, chemischen oder thermischen Irritationen und verhindert das Eindringen pathogener Keime.

2.5.2.2 Proliferationskinetik

Das Epithel der Mundhöhle gehört zu den Umsatzgeweben. Es liegt hierbei ein ständiger Nachschub an Zellen durch Mitosen in der Germinativschicht vor, welcher den immerwährenden Zellverlust an der Epitheloberfläche infolge mechanischer und chemischer Beanspruchung kompensiert. Dieses genau eingestellte Gleichgewicht von Zellverlust und Zellneubildung wird als „steady state“ bezeichnet (Herrmann, et al., 2006). Charakteristisch für Umsatzgewebe ist die hierarchische Organisation der Proliferation von Stammzellen über begrenzt teilungsfähige Transitzellen bis zu reifen, postmitotischen Funktionszellen (Dörr,

2009b; Herrmann, et al., 2006). Eine detaillierte Beschreibung der hierarchischen Organisation der Proliferation von Umsatzgeweben findet sich in 2.2.1.

Die hierarchische Struktur der Proliferation des Mundhöhlenepithels korreliert eng mit dem Ausmaß der Undulationen der Basalmembran (Kellett, et al., 1989). Das Ausmaß der Hierarchie äußert sich durch Unterschiede in den Zellzykluszeiten zwischen Stamm- und verschiedenen Transitzellpopulationen; dies ist sehr ausgeprägt an den mechanischen Papillen der Zungenoberseite (Hume und Potten, 1983; Hume und Potten, 1980). Im glatten Epithel des Mundbodens sind Undulationen und damit eine ausgeprägte Hierarchie nicht bzw. kaum nachweisbar. Dies und die einheitlichen Zellzykluszeiten deuten auf eine homogene Zellpopulation ohne proliferative Hierarchie hin. Gleiches kann für die Zungenunterseite angenommen werden, weshalb alle proliferierenden Zellen im Epithel der Zungenunterseite als Stammzellen angesehen werden können (Dörr, 1997a).

Die Zellzahl und die absolute Zellproduktion im Epithel der humanen Mundschleimhaut variieren in Abhängigkeit von der Lokalisation in der Mundhöhle (Dörr, 1997a; Dörr, et al., 1995). Eine hohe Zellzahl ist dabei immer mit einer hohen Zellproduktion verbunden. Die Umsatzzeit ist in allen Bereichen der Mundhöhle mit ca. sechs Tagen gleich (Dörr, et al., 2002a). Die Proliferation im Epithel der humanen Mundhöhle unterliegt einem zirkadianen Rhythmus. Die maximale DNA-Syntheseaktivität wurde im Zeitraum zwischen 11:00 und 16:00 Uhr bestimmt (Bjarnason, et al., 1999). In einer anderen Studie wurde diese jedoch um 22:00 Uhr beschrieben (Warnakulasuriya und MacDonald, 1993). Diese Diskrepanz ist möglicherweise auf die verschiedenen Techniken zur Zellzyklusbestimmung und interindividuelle Unterschiede zwischen den Probanden zurückzuführen.

2.5.3 Murine Mundschleimhaut

2.5.3.1 Besonderheiten im Aufbau der murinen Mundschleimhaut

In der vorliegenden Arbeit wird als Tiermodell die Schleimhaut der Zungenunterseite der Maus verwendet, weshalb in den folgenden Abschnitten speziell auf die Eigenschaften dieses Gewebes beim verwendeten Mausstamms C3H/Neu eingegangen wird.

Die Länge der Zunge der Maus beträgt etwa 10 mm, sie ist etwa 5 mm breit und 1 bis 2 mm dick (Dörr, 1987). Die Zunge besteht hauptsächlich aus quergestreifter Muskulatur, umgeben von Binde-, Drüsen- und Fettgewebe. Das Epithel von Zungenrücken, Zungenspitze und seitlichen Zungenrändern trägt eine Vielzahl von Geschmacks- und Tastpapillen (Schumacher, 1997)

Das Zungenepithel der Maus ist ein mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel (Abb. 2): Auf der Basalmembran liegt die Basalzellschicht (*Stratum basale*) mit zylindrischen Zellen und längsovalen Zellkernen. Daran schließt sich die durch polygonale Zellen mit runden

Zellkernen charakterisierte Stachelzellschicht (*Stratum spinosum*) an. Die Bezeichnung ist auf die Morphologie nach der fixationsbedingten Schrumpfung der Zellen zurückzuführen, welche an den Stellen der Zell-Zell-Kontakte (Desmosomen) in geringerem Ausmaß erfolgt (Freinkel und Woodley, 2001). Zusammen bilden die Basalzellschicht und die tiefe Stachelzellschicht die proliferierende **Germinativschicht** (Hill, 1984), in welcher die gesamte Zellproduktion stattfindet. Über der Stachelzellschicht findet sich die Körnerzellschicht (*Stratum granulosum*) mit flachen spindelförmigen Zellen. Charakteristisch für diese Zellen sind basophile Keratohyalingranula im Zytoplasma. Die nichtproliferierenden Anteile des *Stratum spinosum* und das *Stratum granulosum* werden als **funktionelle Schicht** bezeichnet und umfassen alle postmitotischen kernhaltigen Zellen (Dörr, 1997a). Den oberflächlichen Abschluss bildet das kernlose *Stratum superficiale*, bestehend aus der **Keratinschicht** (*Stratum corneum*), deren Hornsubstanz (Keratin) aus umgewandelten Zellen besteht (Welsch, 2010). Die Gesamtdicke des Zungenepithels der Maus (Stamm C3H/Neu) beträgt ca. 100 µm (Dörr, 1997a).



Abb. 2: Histologischer Aufbau der Schleimhaut der Zungenunterseite der Maus

1: Basalzellschicht, 2: Stachelzellschicht, 3: Körnerzellschicht, 4: Keratinschicht 400fache Vergrößerung, Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung (eigenes Foto)

2.5.3.2 Proliferationskinetik des Epithels der Zungenunterseite der Maus

In der unbehandelten Schleimhaut der Zungenunterseite bei Nagetieren folgt die Zellproliferation einem ausgeprägten diurnalen Rhythmus (Dörr und Kummermehr, 1991; Potten, et al., 2002). Die Zellproliferation wird durch den Verlust oberflächlicher Epithelzellen

durch mechanische Beanspruchung bei der Nahrungsaufnahme stimuliert und unterliegt damit dem Hell-Dunkel-Rhythmus (Burholt, 1986; Dörr, 1997a; Dörr, et al., 1993). Die maximale Mitoserate des Epithels der Zungenunterseite des Mausstamms C3H/Neu wurde um 10:00 Uhr gemessen, die maximale DNA-Synthese acht Stunden früher (Dörr und Kummermehr, 1991). Bei Mäusen dieses Stammes sind täglich 27,9 % der Germinativzellen, und damit 19,7 % der Gesamtzellen, aktiv proliferierend (Dörr und Kummermehr, 1991). Die durchschnittliche Zellzyklusdauer für Zellen der Germinativschicht beträgt 3,6 Tage, die tägliche Zellproduktion beträgt ca. 85 Zellen/mm bei einer Gesamtzellzahl von 430 Zellen/mm (Dörr, 1997a). Die Umsatzzeit des Gesamtepithels beträgt ca. fünf Tage (Dörr, et al., 1994a; Dörr, et al., 1996b; Dörr, et al., 2002a; Dörr und Kummermehr, 1991; Dörr und Weber-Frisch, 1995a; Dörr und Weber-Frisch, 1995b) und ist damit ähnlich der Umsatzzeit der humanen Mukosa (Dörr, et al., 2002a). Humane und murine Mundschleimhaut sind somit hinsichtlich Proliferationsrate, zellkinetischer Parameter und Strahlenreaktion vergleichbar, so dass eine qualitative Übertragung der Ergebnisse aus dem Mausmodell auf den Menschen zulässig erscheint. Innerhalb verschiedener Mausstämme gibt es Abweichungen bezüglich der Proliferationsparameter und der Umsatzzeit (Dörr, et al., 2002d).

2.6 Tiermodelle zur Untersuchung der radiogenen oralen Mukositis

Es existieren mehrere Tiermodelle zur Untersuchung der Wirkung einer Strahlenexposition auf die Mundschleimhaut. Erste Untersuchungen zur Strahlenreaktion an Plattenepithelien wurden an der Haut von Schweinen, Mäusen und Ratten durchgeführt. Allerdings sind diese Ergebnisse nur beschränkt auf die Mundschleimhaut übertragbar, da sich Haut und Schleimhaut hinsichtlich Anatomie, Physiologie und Proliferation wesentlich voneinander unterscheiden (Dörr, 1987). Als etablierte Modelle zur Untersuchung der radiogenen oralen Mukositis dienen heute die Mundschleimhaut der Maus und der Ratte sowie die Schleimhaut der Backentasche des Hamsters.

2.6.1 Maus

Im Jahr 1962 wurden von Goepp und Fitch die Auswirkungen einer Bestrahlung des Kopfes auf die murine Mundschleimhaut beschrieben (Goepp und Fitch, 1962). Ausgewertet wurden dabei die Überlebenszeit der Tiere nach Bestrahlung und histologische Veränderungen der Zunge und des Gaumens. Später verwendeten Parkins et al. die Mäuselippe zur Untersuchung der Strahlenreaktion der Haut und der Mundschleimhaut (Parkins, et al., 1983). Endpunkte waren Erythembildung, Desquamation und Krustenbildung der Lippen. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die reine Mundschleimhaut des Menschen war jedoch begrenzt, da die Lippe histologisch ein Mischgewebe von Haut und Schleimhaut darstellt. In Folge der ausgeprägten Strahlenreaktion kam es zu schweren Einschränkungen der

Nahrungsaufnahme, welche zu signifikanten Gewichtsverlusten innerhalb von sechs bis neun Tagen führten. Ein möglicher Einfluss des Gewichtsverlustes auf die Ausprägung der Schleimhautreaktion konnte nicht ausgeschlossen werden.

Das Epithel der Zungenunterseite der Maus wurde 1986 als Modell für strahlenbiologische Untersuchungen eingeführt (Moses und Kummermehr, 1986). Als Endpunkt der Strahlenreaktion wurde die Bildung ulzerativer Läsionen definiert. Die Schleimhautläsionen an Zungenspitze und -rändern führten zu einer Beeinträchtigung der Futteraufnahme, wodurch die Tiere deutlich an Gewicht verloren. Zur Reduktion der Belastung der Tiere durch diese Nebenwirkungen wurde das Feld der lokalen Testbestrahlung und der damit assoziierten klinischen Reaktionen von Dörr auf eine Fläche von $3 \times 3 \text{ mm}^2$ begrenzt (Dörr, 1987). Dadurch wurde eine uneingeschränkte Futteraufnahme ermöglicht und Gewichtsverluste vermieden. Zusätzlich fand die fraktionierte Bestrahlung der Schnauzen ohne Anästhesie statt und die Dosen pro Fraktion wurden soweit reduziert, dass nur eine subklinische Schädigung des Epithels der Zungenunterseite erfolgte (Dörr, 1987). Ein klinisch sichtbarer Schaden (Ulzeration) wurde durch eine anschließende Aufsättigungsbestrahlung (Test- oder top-up-Bestrahlung) induziert, welche sich auf das oben beschriebene Feld beschränkte.

2.6.2 Hamster

Ein weiteres Tiermodell zur Untersuchung der oralen Mukositis, welches 1990 von Sonis etabliert wurde, ist die Schleimhaut der Hamster-Backentasche (Sonis, et al., 1990). Vorteil dieses Modells ist die leichte Zugänglichkeit der Backentasche und die Größe der zu beurteilenden Schleimhautfläche. Ein Nachteil ist, dass die Schleimhaut mechanisch irritiert werden muss, um eine Mukositis auszulösen. Es wurden Studien zur radiogenen *Mucositis enoralis* in Verbindung mit Einzeitbestrahlung (Caluwaerts, et al., 2010; Hwang, et al., 2005; Murphy, et al., 2008; Murray, et al., 2010; Sonis, 2010; Wu, et al., 2012) und fraktionierter Bestrahlung (Ara, et al., 2008; Watkins, et al., 2010; Wu, et al., 2012) durchgeführt. Dieses Modell findet vor allem in Verbindung mit Chemotherapie-induzierten epithelialen Veränderungen Anwendung (Alvarez, et al., 2003; Sonis, et al., 1990; Watkins, et al., 2010).

2.6.3 Ratte

Die Schleimhaut der Zungenunterseite der Ratte wurde 1987 von Dörr erstmals als Tiermodell für strahlenbiologische Untersuchungen beschrieben (Dörr, 1987). Dieses Modell wurde auch für weitere Studien zur radiogenen oralen Mukositis verwendet (Rezvani und Ross, 2004). Es wurde ebenfalls ein lokal begrenztes Feld der Zungenunterseite bestrahlt und die Ulzeration als klinischer Endpunkt definiert.

Ein alternatives Modell stellt die fraktionierte Bestrahlung des gesamten Kopfes der Ratte dar (Cassatt, et al., 2005; Cassatt, et al., 2003). Weitere Untersuchungen zur Beeinflussung der radiogenen Mucositis enoralis bei Bestrahlung des gesamten Kopfes mit Einzeldosen von 15 bzw. 25 Gy wurden beispielsweise von Üçüncü et al. (Üçüncü, et al., 2006) und Lee et al. (Lee, et al., 2007) durchgeführt. Dieses Modell unterliegt allerdings den gleichen Einschränkungen wie das Modell der Mäuselippe (siehe 2.6.1).

2.7 Einflussfaktoren der Strahlenempfindlichkeit von Geweben

Die Strahlentoleranz von Geweben wird von vier Faktoren beeinflusst, welche von Withers (Withers, 1975b) als die „4 R der Radiotherapie“ bezeichnet wurden: Recovery (Erholung), Repopulierung, Redistribution, Reoxygenierung. Als fünftes „R“ wurde von Steel die intrinsische Radiosensibilität eingeführt (Steel, et al., 1989). Das bestrahlte Volumen (Volumeneffekte) wurde von Dörr und van der Kogel als weiterer Parameter eingeführt (Dörr und Van der Kogel, 2009).

2.7.1 Intrinsische Strahlenempfindlichkeit

Die intrinsische Strahlenempfindlichkeit eines Gewebes wird entsprechend des Stammzellkonzepts definiert von der Anzahl der gewebespezifischen Stammzellen und deren Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung (Dörr, 2009c; Herrmann, et al., 2006; Trott, et al., 2002). Das Stammzellkonzept sagt aus, dass Stammzellen diejenige Zellpopulation im Normalgewebe sind, welche nach Strahlenexposition die Integrität und Struktur des Gewebes wieder herstellen können (Dörr und Herrmann, 2003; Trott, et al., 2002). Die begrenzt teilungsfähigen Transitzellen als Tochterzellen der Stammzellen und die differenzierten Funktionszellen haben hingegen keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit eines Gewebes. Das Stammzellkonzept muss allerdings als rein funktionell verstanden werden, da bisher in der Mehrzahl der Gewebe keine spezifischen Merkmale zur Identifizierung von Stammzellen bekannt sind (Dörr, 2006; Dörr, 2009b). Für die Schleimhaut der Zungenunterseite wird davon ausgegangen, dass alle proliferierenden Zellen auch Stammzellen sind (siehe auch 2.5.3.2) (Dörr, 1997a).

Die intrinsische Strahlenempfindlichkeit von Zellen kann durch die Überlebensrate klonogener Stammzellen nach Bestrahlung in der Zellkultur beschrieben werden. Als klonogene Zellen werden diejenigen Zellen bezeichnet, welche im Koloniebildungstest mehr als 50 Tochterzellen bilden. Die Überlebensrate (surviving fraction, SF) klonogener Zellen nach Bestrahlung wird in Abhängigkeit von der Strahlendosis als Zellüberlebenskurve dargestellt und durch eine linear-quadratische Funktion beschrieben (Thames und Hendry, 1987):

$$-\ln[\text{SF}] = \alpha D + \beta D^2$$

Die lineare Komponente αD beschreibt die Anfangsneigung der Schulterkurve, der quadratische Anteil der Gleichung βD^2 steht für die Krümmung der Kurve (Abb. 3). Die Parameter α und β sind zell- und strahlungsspezifische Konstanten, D ist die applizierte Dosis.

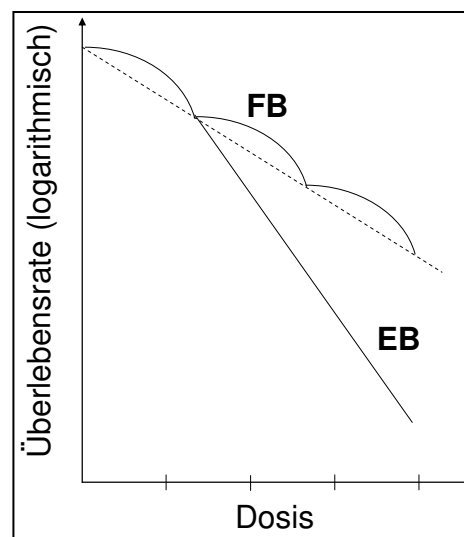


Abb. 3: Zellüberlebenskurven nach Einzel- und fraktionierter Bestrahlung (modifiziert nach Herrmann et al. 2006)

Dargestellt ist eine charakteristische „Schulterkurve“ nach Einzelbestrahlung (EB), welche bei hohen Dosen in einen exponentiellen Verlauf übergeht. Bei einer fraktionierten Bestrahlung (FB) kehren die überlebenden Zellen nach einem ausreichenden Zeitabstand zur vorangegangenen Bestrahlung in den Ausgangszustand zurück und die „Schulter“ wiederholt sich, so dass insgesamt bei gleicher Gesamtdosis im Vergleich zur Einzelbestrahlung ein höheres Überleben resultiert (siehe auch 2.7.2).

Zur Beschreibung der Strahlensensibilität von Keratinozyten wurden nach Dörr (Dörr, 1997a) durchschnittliche Werte von $\alpha = 0,2 \text{ Gy}^{-1}$ und $\beta = 0,02 \text{ Gy}^{-2}$ angenommen, wodurch sich eine durchschnittliche Überlebensrate von 62 % (2 Gy) bzw. 46 % (3 Gy) ergab. Die linear-quadratische Analyse der experimentellen Daten der Mundschleimhaut ergab Werte für

$\alpha = 0,28 \text{ Gy}^{-1}$ bzw. $0,16 \text{ Gy}^{-1}$ und $\beta = 0,024 \text{ Gy}^{-2}$ bzw. $0,013 \text{ Gy}^{-2}$ (Dörr, et al., 1993; Nickstadt, 2001)

2.7.2 Recovery (Erholung)

Recovery ist die Fähigkeit von Zellen oder Geweben, einen Teil der applizierten Dosis nach einer Bestrahlung zu kompensieren. In Abb. 3 ist dies für die *in vitro* Situation durch den Verlauf der Überlebenskurve in sich wiederholenden „Schultern“ veranschaulicht. Durch Bestrahlung werden sowohl primär zytoletale als auch subletale Schäden induziert. Die Wechselwirkung von mehreren subletalen Schäden führt bei räumlicher und zeitlicher Interaktion zum Zelltod. Bei Aufteilung einer Strahlendosis in zwei oder mehrere Fraktionen treten Erholungsprozesse zwischen den Fraktionen auf, so dass subletale Schäden nicht akkumulieren können (Elkind und Sutton, 1960; Herrmann, et al., 2006). Dies bedingt die Applikation einer größeren Gesamtdosis zum Erreichen eines bestimmten Effekts (Dörr, et al., 2000; Herrmann, et al., 2006; Thames und Hendry, 1987; Weber und Wenz, 2013).

Zur Beschreibung des Fraktionierungseffekts dient das linear-quadratische Modell (Thames und Hendry, 1987) (siehe 2.7.1). Die gewebespezifische Erholungskapazität wird dabei durch den α/β -Wert beschrieben. Ist dieser niedrig (1-4 Gy), ist der Fraktionierungseffekt ausgeprägt, d.h. die Erholungsfähigkeit ist hoch (Herrmann, et al., 2006). Der α/β -Wert ist abhängig von der Strahlenqualität, der betrachteten Zellart bzw. dem Gewebe und dem untersuchten Endpunkt (Dörr, 2010). Mit durchschnittlich 11 Gy ist der α/β -Wert der Mundschleimhaut relativ hoch (Dörr, et al., 1993), entsprechend einem weniger ausgeprägten, aber signifikant nachweisbaren Fraktionierungseffekt (Dörr, 1997a; Dörr, et al., 1993; Pabst, et al., 2004).

Die Erholung von subletalen Schäden folgt einer exponentiellen Kinetik und kann durch eine Erholungshalbwertszeit beschrieben werden (Herrmann, et al., 2006). Diese beträgt für die Mundschleimhaut von Mäusen 46 Minuten (Dörr, et al., 1993), für die humane Mundschleimhaut zwei bis vier Stunden (Bentzen, et al., 1996). Die Erholungshalbwertszeiten variieren in Abhängigkeit vom jeweiligen Gewebe und Endpunkt und können fünf Stunden und länger sein. Es wird deshalb empfohlen, in der Klinik Abstände von mindestens sechs bis acht Stunden zwischen den Fraktionen einzuhalten (Herrmann, et al., 2006).

2.7.3 Repopulierung

Repopulierung beschreibt Regenerationsprozesse, mit denen Umsatzgewebe und Tumoren auf eine fraktionierte, zeitlich ausgedehnte Strahlentherapie reagieren. Repopulierungsvorgänge bewirken zusätzlich zum Fraktionierungseffekt eine weitere Erhöhung der isoeffektiven Dosen bei Verlängerung der Gesamtbehandlungszeit. Dadurch

kommt es zu einer Verminderung von Frühnebenwirkungen, aber gleichzeitig auch zu einer Beeinträchtigung der Tumorheilungschancen (Herrmann, et al., 2006). Repopulierung beruht auf einer komplexen Reorganisation der proliferativen Struktur des Gewebes (Dörr, 2009c).

Der Beginn der Repopulierung relativ zum Beginn der Bestrahlung kann zwischen verschiedenen Geweben variieren und ist abhängig von der jeweiligen Umsatzzeit (Dörr, 1997b; Dörr, 2009c; Dörr und Herrmann, 2003; Hopewell, et al., 2003). Im Epithel der Mäusezunge beginnt die Repopulierung in der ersten Bestrahlungswoche, die maximale Regenerationsleistung wird in der zweiten Woche erreicht (Dörr, 1997a; Dörr und Kummermehr, 1990). Dabei ist die Repopulierungsleistung der Schleimhaut der Maus umso effektiver, je höher die Dosis während der ersten Behandlungswoche(n) ist (Dörr, 2003).

Zugrunde liegen dabei drei Mechanismen, welche auch als die drei A's zusammengefasst werden: **Asymmetrieverlust** der Teilung der Stammzellen, **Akzeleration** der Stammzellteilung und **abortive Teilungen** schon letal geschädigter Zellen (Dörr, 1997b; Dörr, 2003; Dörr, 2009c). Die Teilung von Stammzellen in unbehandelten Geweben in durchschnittlich eine neue Tochterstammzelle und eine Transit- bzw. sich differenzierende Zelle wird als asymmetrische Teilung bezeichnet (Dörr, 2009c). Dadurch bleibt die Zahl der Stammzellen im Gewebe konstant. Um den Stammzellverlust nach Bestrahlung auszugleichen, kommt es zu einem **Asymmetrieverlust**, d.h. die Stammzellen teilen sich symmetrisch in zwei Tochterstammzellen (Dörr, 2009c; Herrmann, et al., 2006).

Zur Kompensation des Stammzellverlustes trägt weiterhin eine **akzelerierte Stammzellteilung** bei. Die durchschnittliche Zellzykluszeit in der unbehandelten Mundschleimhaut beträgt 3,5 Tage, nach fraktionierter Bestrahlung verkürzt sie sich dosisabhängig auf bis zu 1,4 Tage (Dörr, 2009c; Dörr, et al., 1994a).

Durch Bestrahlung sterilisierte Stammzellen können noch eine begrenzte Anzahl an Zellteilungen durchlaufen, bevor sie endgültig absterben. Diese **abortiven Teilungen** tragen zur Kompensation des Gesamtzellverlustes bei (Dörr, 2009c).

2.7.4 Redistribution

Die Strahlenempfindlichkeit von Zellen variiert mit den Phasen des Zellzyklus. Die höchste Strahlensensibilität besitzen Zellen während der Mitose und in der G2-Phase. Dagegen weisen sie die höchste Strahlenresistenz am Ende der S-Phase auf (Chang, et al., 2014; Herrmann, et al., 2006; Sinclair und Morton, 1965; Zips, 2009). Während einer Bestrahlung werden überwiegend Zellen in strahlenempfindlichen Phasen abgetötet. Dadurch steigt der Anteil von Zellen in den resistenten Phasen des Zellzyklus an. Diese überlebenden Zellen zeigen zudem eine reversible Blockade am Übergang der G2- zur M-Phase („G2-Block“). Dies führt zur Synchronisation dieser Zellen im Zellzyklus (Herrmann, et al., 2006). Mit zunehmender Zeit nach Bestrahlung werden die Zellen aufgrund von geringen

Unterschieden in der Zellzykluszeit wieder auf alle Phasen des Zellzyklus verteilt (Redistribution) (Herrmann, et al., 2006; Withers, 1975a; Zips, 2009). Allerdings beruhen diese Beobachtungen auf Untersuchungen an Zellkulturen; in Normalgeweben und Tumoren sind diese Effekte von untergeordneter Bedeutung (Dörr, 2010).

2.7.5 Reoxygenierung

Die zelluläre Strahlenempfindlichkeit ist abhängig von der Sauerstoffkonzentration in den Zellen während der Bestrahlung. Gut mit Sauerstoff versorgte Zellen sind gegenüber anoxischen Zellen um bis zu einen Faktor drei strahlenempfindlicher (Herrmann, et al., 2006). Die Versorgung neoplastischer Zellen im wachsenden Tumor wird durch die Ausbildung neuer Gefäße gewährleistet. Nimmt das Tumolvolumen jedoch schneller zu, als Gefäße gebildet werden, so bilden sich hypoxische und somit strahlenresistente Areale innerhalb des Tumors. Dies geschieht entweder in Abhängigkeit von der Distanz der Tumorzellen zu Kapillaren (diffusionslimitierte Hypoxie) oder in unmittelbarer Nähe zu den Kapillaren durch temporäre Gefäßverschlüsse (perfusionslimitierte Hypoxie) (Horsman, et al., 2009). Während der Bestrahlung werden zunächst die Zellen in den euoxischen Bereichen des Tumors abgetötet. Die überlebenden, vorher hypoxischen Tumorzellen werden durch z.B. eine verbesserte Mikrozirkulation oder Öffnung temporär verschlossene Gefäße besser mit Sauerstoff versorgt (Reoxygenierung). Es ist davon auszugehen, dass die Reoxygenierung in Normalgeweben kaum eine Rolle spielt, da dort keine oder ein konstanter Anteil hypoxischer Zellen vorkommen (Dörr, 2010).

2.7.6 Volumeneffekt

Bei einer Strahlentherapie werden neben dem Tumorgewebe immer signifikante Anteile an Normalgeweben bestrahlt, in denen sich somit Nebenwirkungen manifestieren können. Dies können sowohl normale Strukturen innerhalb des Tumors sein (Gefäße, Bindegewebe), als auch das Normalgewebe in unmittelbarer Nähe des Tumors und in den Ein- und Austrittskanälen der Strahlung. Durch Verbesserung der Bestrahlungstechniken wurde das Normalgewebsvolumen, welches signifikanten Dosen ausgesetzt ist, vermindert. Dies führte zu einer Zunahme der Inhomogenität der Dosisverteilung innerhalb der Normalgewebe (Dörr und Van der Kogel, 2009).

Withers et al. führten die Unterteilung eines Organs in funktionelle Untereinheiten (functional subunits, FSU) ein (Withers, et al., 1988). Definitionsgemäß ist eine funktionelle Untereinheit die größte Anzahl an Zellen bzw. Gewebestruktur, welche von einer einzigen überlebenden klonogenen Zelle regeneriert werden kann (Dörr und Van der Kogel, 2009). Die Organisationsstruktur der funktionellen Untereinheiten bedingt den Effekt der Bestrahlung

unterschiedlicher Organvolumina. Bei paralleler Anordnung der FSU (z.B. in Lunge, Leber, Niere) funktionieren diese unabhängig voneinander. Erst wenn eine kritische Anzahl an FSUs durch Bestrahlung geschädigt wurde, kann die physiologische Funktion des Organs nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt zur klinischen Manifestation von Nebenwirkungen. Das Risiko von Nebenwirkungen ist von der Verteilung der Gesamtdosis innerhalb des Organs und weniger von einzelnen Dosisspitzen („hot spots“) abhängig. Bei einer seriellen Anordnung der FSUs (z.B. in Rückenmark, Darmschleimhaut, Ösophagus) ist die Organfunktion von jeder einzelnen FSU abhängig, der Ausfall einer FSU führt zur Funktionsstörung im gesamten nachgeschalteten Organvolumen. In diesem Fall bestimmen einzelne Dosisspitzen das Risiko für Nebenwirkungen. Die Organisation der meisten Organe ist jedoch weder streng parallel noch seriell (Dörr und Van der Kogel, 2009).

Auch die Lokalisation der Dosisdeposition innerhalb eines Organs ist von Bedeutung für die klinischen Konsequenzen. Der Ausschluss der Lippen aus dem bestrahlten Volumen führt zu einer signifikanten Reduktion von Komplikationen in Folge einer radiogenen oralen Mukositis (Dörr und Van der Kogel, 2009).

2.8 Der Sphingomyelin-Signalweg

2.8.1 Sphingomyelin

Sphingolipide umfassen ein breites Spektrum an Lipidmolekülen, welche eine Vielzahl von Signalkaskaden und zelluläre Funktionen regulieren (Hannun und Obeid, 2008). Das zu den Sphingolipiden gehörende Phospholipid Sphingomyelin ist ein Bestandteil der Zellmembran von Säugetieren. Besonders häufig kommt es in den Myelinscheiden der Axone der Nervenzellen vor. Das Rückgrat bildet der Aminoalkohol Sphingosin, welcher mit einer langkettigen Fettsäure und der polaren Kopfgruppe Phosphocholin verbunden ist (Nelson und Cox, 2001).

2.8.2 Ceramide

Ceramide sind hydrophobe Sphingosinmoleküle, welche über eine Amidbindung an eine Fettsäure gebunden sind (Abb. 4). Die Länge der Fettsäure variiert in den meisten Säugetierzellen zwischen 14 und 24 Kohlenstoffatomen (Kolesnick, et al., 2000). Das bioaktive Lipid Ceramid ist als „second messenger“ in zelluläre Signalwege eingebunden und an der Regulation verschiedenster zellulärer Prozesse, wie z.B. Wachstumsstillstand und Apoptose, Differenzierung, Proliferation, Stressreaktionen, Seneszenz und Umbau von Zytoskelettstrukturen, beteiligt (Horres und Hannun, 2012; Uchida, 2014; van Blitterswijk, et al., 2003; Wu, et al., 2010). Die Generierung von Ceramiden erfolgt sowohl durch die hydrolytische Spaltung von Sphingomyelin mittels Sphingomyelinasen als auch durch *de novo* Synthese mittels Ceramid-Synthasen (Perry, 2002; Stoffel, 1999).

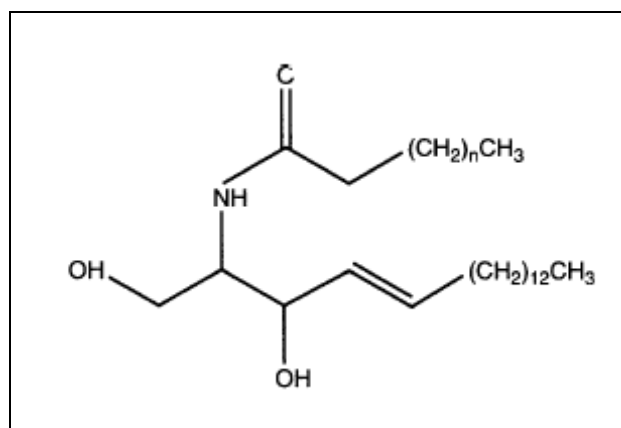


Abb. 4: Strukturformel von Ceramid (Kolesnick und Fuks, 2003)

2.8.3 Sphingomyelinasen

Das Enzym Sphingomyelinase (SMase) (EC 3.1.4.12) spaltet die Phosphodiesterbindungen von Sphingomyelin hydrolytisch in Phosphocholin und Ceramid. Es sind verschiedene Isoformen bekannt, welche anhand ihrer individuellen pH-Optima unterschieden werden: neutrale Sphingomyelinase, saure Sphingomyelinase und alkalische Sphingomyelinase.

Bezüglich der **neutralen Sphingomyelinase (nSMase)** wird eine Mg^{2+} -abhängige und eine Mg^{2+} -unabhängige Form unterschieden; das pH Optimum ist 7,4. Derzeit sind vier Isoformen der Mg^{2+} -abhängigen neutralen Sphingomyelinase bekannt (nSMase1, nSMase2, nSMase3, mitochondrial associated nSMase), welche sich hinsichtlich der gewebeabhängigen Expressionsmuster und intrazellulären Lokalisation unterscheiden (Clarke, et al., 2011; Wu, et al., 2010). Neutrale Sphingomyelinasen sind in vielfältige Signalkaskaden physiologischer Reaktionen wie z.B. Hemmung des Zellwachstums, Apoptose, Entzündungsreaktionen, Wachstum und Entwicklung eingebunden (Wu, et al., 2010). Eine Aktivierung der neutralen Sphingomyelinasen kann z.B. durch immunmodulierende Zytokine (TNF- α , IL-1, LPS), oxidativen Stress (ROS), Chemotherapeutika oder UV-Strahlung erfolgen (Dinesh, et al., 2011; Martinez, et al., 2012; Wu, et al., 2010; Yabu, et al., 2015).

Gegenstand der tierexperimentellen Arbeiten in der vorliegenden Arbeit ist u.a. die Hemmung der Mg^{2+} -abhängigen nSMase1 mittels Glutathion. Sie wird ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert und ist Bestandteil der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates (Tomiuk, et al., 2000; Wu, et al., 2010; Yabu, et al., 2015). Das integrale Membranprotein besitzt zwei transmembrane Domänen am C-terminalen Ende (Tomiuk, et al., 1998). Die neutrale Sphingomyelinase1 wurde erstmals 1998 kloniert und aufgrund ihrer Homologien mit bakteriellen Sphingomyelinasen identifiziert. Das humane Enzym hat eine Länge von 423 Aminosäuren, das Molekulargewicht beträgt 47,5 kDa (Tomiuk, et al., 1998).

Die Aktivierung der nSMase1 durch die Phosphorylierung des 270-Ser mittels c-jun N-terminaler Kinase (JNK) wurde an embryonalen Zebrafisch-Zellkulturen und humanen Jurkat t-Zellen nachgewiesen (Yabu, et al., 2015). In Verbindung mit dem JNK-Signalweg ist die nSMase1 verantwortlich für die Induktion der Apoptose mittels Ceramidakkumulation bei Einwirkung verschiedener Stressfaktoren (Hitze, UV-Licht, H_2O_2 -Behandlung und γ -Strahlung) (Yabu, et al., 2015). Die physiologische Funktion der nSMase1 ist bis jetzt nicht vollständig geklärt; nSMase1-Knockout-Mäuse zeigten keinen Phänotyp (Wu, et al., 2010; Zumbansen und Stoffel, 2002).

Die **saure Sphingomyelinase (aSMase)** umfasst eine sekretorische und eine lysosomale Form, deren pH-Optimum *in vitro* zwischen 4,5 und 5 liegt. Das Molekulargewicht des Enzyms beträgt - in Abhängigkeit von der Glykosylierung - etwa 72 kDa (Lansmann, et al., 1996), die Länge beträgt 629 Aminosäuren (Quintern, et al., 1989; Schuchman, et al., 1991).

Die saure Sphingomyelinase ist an der Signalweiterleitung verschiedener Stimuli wie ionisierende Strahlung (Paris, et al., 2001), Chemotherapeutika (Dimanche-Boitrel, et al., 2005) und der Zytokine Fas/CD95 (Grassmé, et al., 2003) und TNF- α (García-Ruiz, et al., 2003) beteiligt. Die Aktivierung des Enzyms umfasst die Translokation in die äußere Hülle der Plasmamembran, welche auch der Ort der Sphingomyelinhydrolyse ist (Kolesnick, 2002). Da die Bedeutung der mit der sauren Sphingomyelinase assoziierten Signalketten für die Entstehung der radiogenen *Mucositis enoralis* bisher nicht eindeutig geklärt ist, wurde in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung der Hemmung des Enzyms mittels Desipramin auf die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut geprüft.

Hinsichtlich Struktur und Eigenschaften unterscheidet sich die **alkalische Sphingomyelinase** von der sauren und neutralen Sphingomyelinase. Sie wird im Verdauungstrakt und der Galle exprimiert/sezerniert. Im Kolon hat die alkalische Sphingomyelinase antiproliferative und antiinflammatorische Eigenschaften, u.a. durch die hydrolytische Spaltung des proinflammatorischen PDG-Faktors (**P**latelet **D**erived **G**rowth) (Duan, 2006; Wu, et al., 2006). Im Gegensatz zu anderen Sphingomyelinasen hat die alkalische Sphingomyelinase ein pH-Optimum von 9,0 und ist resistent gegen den Verdau durch Trypsin (Wu, et al., 2004).

2.8.4 Ceramidsynthese

Die Neubildung von Ceramiden im Endoplasmatischen Retikulum beruht auf mehreren Syntheseschritten. Ceramidsynthese katalysiert die Umsetzung von Sphinganin zu Dihydroceramid, welches anschließend mittels Dihydroceramid-Desaturase zu Ceramid reduziert wird. Bislang sind sechs Isoformen der Ceramidsynthese bekannt, welche sich hinsichtlich ihrer gewebespezifischen Expression und Proteingröße unterscheiden (Levy und Futerman, 2010). Eine Aktivierung der Ceramidsynthese kann durch das Chemotherapeutikum Daunorubicin (Bose, et al., 1995), TNF- α oder auch ionisierende Strahlung induziert werden (Hernández-Corbacho, et al., 2015; Liao, et al., 1999; Mesicek, et al., 2010). Die Generierung von Ceramiden mittels Ceramidsynthese ist deutlich langsamer als die hydrolytische Spaltung von Sphingomyelin und findet in einem Zeitraum von Stunden bis Tagen statt (Bose, et al., 1995; Liao, et al., 1999). Die Enzymaktivität der Ceramidsynthese wird spezifisch von Fumonisin B1 inhibiert (Merrill Jr, et al., 2001), verbunden mit einer antiapoptischen und antiinflammatorischen Wirkung dieser Wirkstoffe *in vivo* (Cuzzocrea, et al., 2008). Die Untersuchungen zum Einfluss der Hemmung der Ceramidsynthese auf die Modulation der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2.8.5 Modulation des Sphingomyelin-Signalweges

Der Sphingomyelin-Signalweg ist ein ubiquitäres, evolutionär konserviertes Signalsystem in Säugetierzellen. Die Aktivierung erfolgt durch die Generierung des „second messengers“ Ceramid mittels Hydrolyse von Sphingomyelin (Santana, et al., 1996) bzw. der Synthese von Ceramid unter Beteiligung der Ceramidsynthase. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die Inhibition der Ceramidbildung auf die Ausprägung der radiogenen *Mucositis enoralis* hat. Auf die Rolle der Bestrahlung und der Inhibitoren des Sphingomyelin- /Ceramid-Signalwegs, die für die vorliegende Arbeit von Bedeutung sind, wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

2.8.5.1 Bestrahlung

Die Bestrahlung von Zellen führt durch Schädigung und fehlerhafte Reparatur der DNA zum klonogenen Zelltod (Ross, 1999). Ionisierende Strahlung induziert die Generierung von Ceramiden, welche als „second messenger“ die intrinsische Apoptose einleiten (siehe 2.8.6) (Morad und Cabot, 2013). Diese Art des Zelltodes wurde bislang *in vitro* in Endothelzellen (Haimovitz-Friedman, et al., 1994), Lymphozyten (Bruno, et al., 1998; Chmura, et al., 1997b), primären Fibroblasten der Haut (Zundel und Giaccia, 1998) sowie malignen Kopf-/Hals-Plattenepithelzellen (Alphonse, et al., 2004; Chmura, et al., 1997a) nachgewiesen. *In vivo* wurde die strahleninduzierte Apoptose durch Generierung von Ceramiden im Lungengewebe von C3H/HeJ Mäusen (Fuks, et al., 1994; Santana, et al., 1996) und im Gefäßendothel der Dünndarmmukosa von C57BL/6 Mäusen nachgewiesen (Rotolo, et al., 2012). Die Aktivierung der sauren und neutralen Sphingomyelinase durch UV- und ionisierende Strahlung ist unabhängig von einer Schädigung der DNA und führt innerhalb von Minuten bis Stunden zu einem Anstieg des intrazellulären Ceramidgehalts (Mathias, et al., 1998). Die *de novo* Synthese von Ceramid durch Ceramidsynthase wird dagegen erst später nach einigen Stunden initiiert (Liao, et al., 1999). Die Bedeutung der sauren Sphingomyelinase für die strahleninduzierte Apoptose wurde mittels aSMase-defizienten Fibroblasten entdeckt, welche erst nach einem aSMase-Gentransfer auf Bestrahlung mit Ceramidakkumulation und Apoptose reagierten (Santana, et al., 1996). Die Beteiligung der neutralen Sphingomyelinase an der strahleninduzierten Sphingomyelinhydrolyse wurde bereits in humanen Erythroblasten-Zelllinien, T-Lymphozyten-Kulturen, murinen Lymphom-Zellen und malignen Kopf-/Hals-Plattenepithelzelllinien nachgewiesen (Alphonse, et al., 2004; Bruno, et al., 1998; Chmura, et al., 1997b; Jaffrézou, et al., 2001; Rodriguez-Lafrasse, et al., 2002). Die Bildung von Ceramiden durch Aktivierung von Ceramidsynthase nach strahleninduzierter DNA-Schädigung wurde *in vitro* in bovinen aortalen Endothelzellkulturen, humanen Adenokarzinomzellen der Prostata, humanen B-Zellen (Liao, et al., 1999) und

humanen Plattenepithelkarzinomzellen des Zervix (Mesicek, et al., 2010) nachgewiesen. Die genauen Mechanismen zur Aktivierung der Sphingomyelinasen nach Bestrahlung sind bis jetzt noch nicht vollständig geklärt.

2.8.5.2 Glutathion

Glutathion ist ein ubiquitär vorkommendes Tripeptid, bestehend aus L-Glutamat, Glycin und L-Cystein (L- γ -glutamyl-L-cysteinylglycin). Das Peptid trägt wesentlich zur Redox-Homöostase der Zelle bei und kommt sowohl in oxidiert (GSSG) als auch reduzierter Form (GSH) vor, wobei intrazellulär der größte Anteil reduziert vorliegt. Die Thiolgruppen der Aminosäure Cystein schützen die Zelle vor oxidativen Stress, indem sie freie Radikale, reaktive Sauerstoffspezies und eine Vielfalt zytotoxischer Elektrophile inaktivieren (Liu und Hannun, 1997). Diese Prozesse sind essentiell für die Zelle und schützen DNA, Proteine und Lipide vor Oxidation.

Die Mg^{2+} -abhängige neutrale Sphingomyelinase wird durch Glutathion gehemmt (Liu und Hannun, 1997). Es wurde vermutet, dass die Inhibition des Enzyms unabhängig von Thiolhaltigen reduzierenden Agenzien ist und auf einer spezifischen allosterischen Hemmung beruht (Liu und Hannun, 1997). Später konnte gezeigt werden, dass nicht die direkte Interaktion von Glutathion und nSMase die Hemmung verursacht, sondern dass die Enzymaktivität indirekt durch das glutathionabhängige Redoxpotential reguliert wird. Das heißt, je höher der Anteil der reduzierten Form von Glutathion (GSH) ist, desto niedriger ist die Aktivität der nSMase (Martín, et al., 2007). Ist die Zelle oxidativem Stress in Form reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ausgesetzt, so sinkt der Anteil reduzierten Glutathions, es kommt zu einer Verschiebung des GSH/ GSSG-Verhältnisses und die Aktivität der nSMase steigt an.

2.8.5.3 Fumonisin B1

Das von dem auf Mais- und Getreidepflanzen vorkommenden Pilz *Fusarium verticillioides* produzierte Mykotoxin Fumonisin B1 ist ein effektiver Inhibitor der Ceramidsynthase. Mit Fumonisin B1 verunreinigtes Getreide wirkt leber- und nierentoxisch und führt bei Menschen und Tieren zu neuronaler Degeneration, Leber- und Speiseröhrenkrebs (Merrill, et al., 1991; Merrill, et al., 1993). Die Hemmung der Ceramidsynthase mittels Fumonisin B1 blockiert die *de novo* Synthese von Ceramid und führt zu einer Akkumulation von Sphingarin, welches die Hauptursache für die toxische Wirkung auf den Organismus ist (Merrill Jr, et al., 2001).

2.8.5.4 Desipramin

Desipramin ist ein funktioneller Inhibitor der sauren Sphingomyelinase. Das Arzneimittel, welches zu den trizyklischen Antidepressiva zählt, wirkt stark antriebssteigernd und stimmungsaufhellend (Coper und Helmchen, 1992). Die inhibierende Wirkung auf die lysosomale saure Sphingomyelinase wurde erstmals in Gliom-Zellkulturen nachgewiesen (Albouz, et al., 1981). Desipramin induziert den intrazellulären proteolytischen Abbau der sauren Sphingomyelinase und senkt gleichzeitig deren enzymatische Aktivität (Hurwitz, et al., 1994).

2.8.6 Apoptose

Der Begriff Apoptose für den programmierten Zelltod wurde 1972 von Kerr eingeführt (Kerr, et al., 1972). Dieser Prozess ist essentiell während Embryonalentwicklung, Wachstum, Differenzierung und Zellumsatz (Wyllie, et al., 1980). Dabei werden alternde, funktionslose oder überzählige Zellen beseitigt, ohne dass das umgebende Gewebe - z.B. durch inflammatorische Reaktionen - geschädigt wird. Charakteristisch für apoptotische Zellen sind die Abnahme des Zellvolumens (Pyknose) (Kroemer, et al., 2009), Chromatinkondensation und eine internucleosomale Fragmentierung der genomischen DNA (Zimmermann, et al., 2001). Die in Membranvesikel verpackten Zellorganellen und die fragmentierte DNA werden von Phagozyten oder benachbarten Zellen aufgenommen und abgebaut.

Die Initiierung der Apoptose kann sowohl durch extrazelluläre (extrinsischer Weg) oder auch durch intrazelluläre Signale (intrinsischer bzw. mitochondrialer Weg) erfolgen (Abb. 5). Der extrinsische Weg kann beispielsweise durch einen Mangel an Wachstumsfaktoren, UV- und Röntgenstrahlung oder Chemotherapeutika eingeleitet werden. Die Bindung der Liganden Fas oder TNF an membranständige Todesrezeptoren leitet das Apoptosesignal mittels Interaktion des intrazellulären Teil des Rezeptors mit FADD (**FAS-associated death domain protein**) in die Zelle weiter (Schultz und Harrington, 2003). Die Amplifizierung des Signals erfolgt mittels Signalkaskade über Caspase 8 und Caspase 3. Inaktive Procaspasen werden dabei durch Spaltung in aktivierte Caspasen überführt. Der intrinsische Weg wird z.B. bei Schädigung der DNA initiiert, wodurch p53 und bax aktiviert werden und zu einem Ausstrom von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytoplasma führen (Liu, et al., 1996). Cytochrom C bildet mit Apaf-1 (**apoptotic protease-activating factor**) das Apoptosom, welches das Signal über Caspase 9 an Caspase 3 weiterleitet. Aktivierte Caspase 3 überträgt die Signalkaskaden des extrinsischen und intrinsischen Weges intrazellulär weiter und führt zur Fragmentierung der DNA (Tait und Green, 2010).

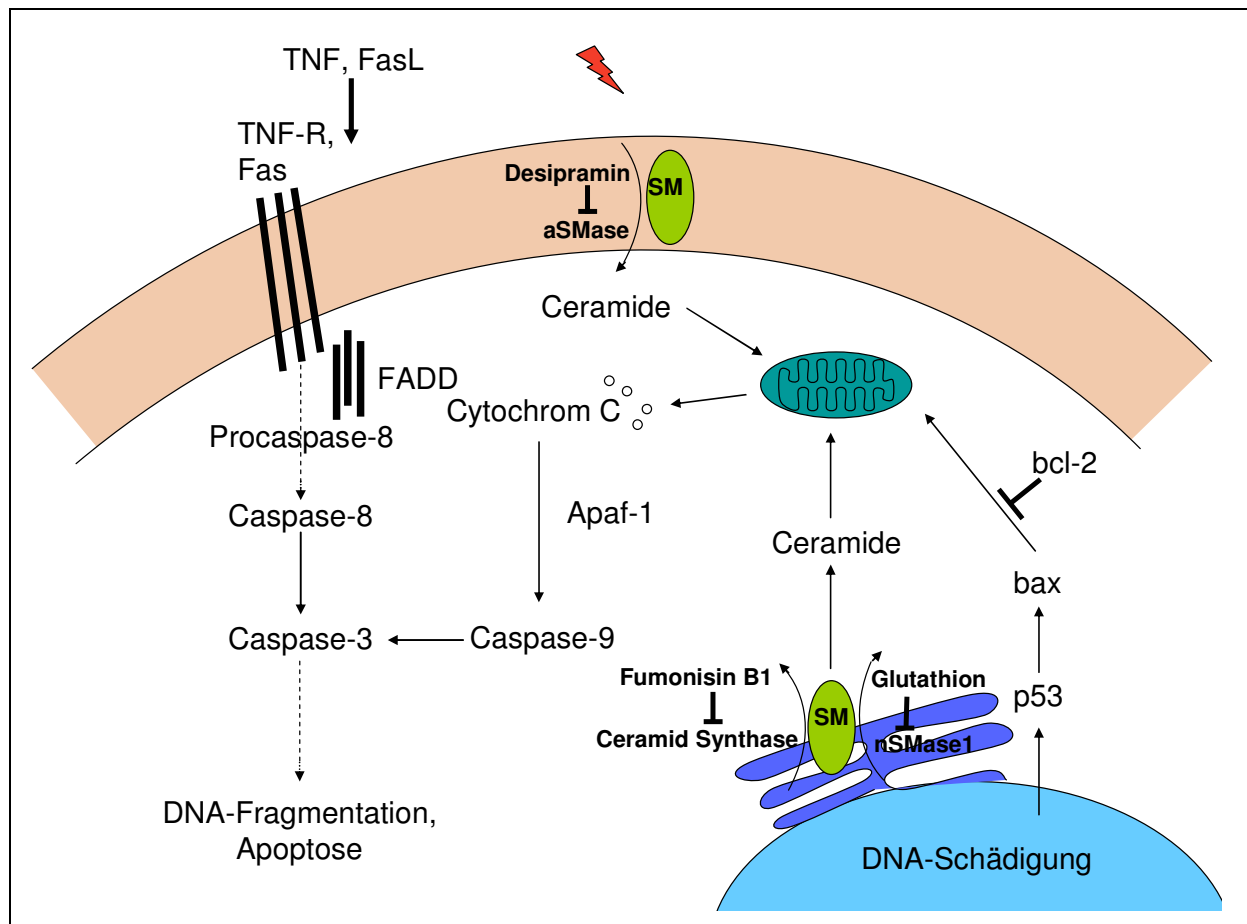


Abb. 5: Vereinfachte Darstellung der Signalwege der extrinsischen und intrinsischen Apoptose (modifiziert nach Schultz und Harrington, 2003 und Lin, et al., 2006)

Die Aktivierung der extrinsischen Apoptose erfolgt durch Bindung von TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) oder Fas-Liganden an den Rezeptoren der Zellmembran. Die intrazelluläre Signalweiterleitung (einschließlich Aktivierung von Caspase-8 und -3) wird durch die Bindung des Rezeptors an FADD (FAS-associated-death-domain protein) initiiert. Der intrinsische Weg wird z.B. nach DNA-Schädigung im Zellkern durch p53 und bax initiiert, welche den Ausstrom von Cytochrom C aus der äußeren Mitochondrienmembran bewirken. Ceramide sind in den intrinsischen Weg eingebunden, welcher die Aktivierung von Caspase-9 durch die Bildung von Apaf-1 umfasst. Ceramide entstehen in der Zellmembran durch hydrolytische Spaltung von Sphingomyelin mittels saurer Sphingomyelinase (aSMase) z.B. nach ionisierender Strahlung. aSMase wird spezifisch durch Desipramin inhibiert. Ceramid-Synthase und neutrale Sphingomyelinase1 (nSMase1) sind in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert und werden spezifisch durch Fumonisin B1 bzw. Glutathion gehemmt. Die irreversible Aktivierung von Caspase 3 führt zur Apoptose der Zelle.

Der intrinsische apoptotische Prozess wird durch eine Vielzahl weiterer Substanzen reguliert, wie z.B. den Proteinen bcl-2 und bax der bcl-2 Familie und auch durch Ceramid (Husari, et al., 2006). Bcl-2 ist ein zytoplasmatisches Protein mit antiapoptotischen Eigenschaften und wurde erstmals aus B-Zell-Lymphomen isoliert. Das Protoonkogen verhindert den Ausstrom vom Cytochrom c in das Zytoplasma und unterstützt dadurch das Überleben der Zelle (Kluck, et al., 1997; Yang, et al., 1997). Die Oligomerisierung der proapoptotischen Proteine bax und bak fördert dagegen die Freisetzung von Cytochrom c durch Porenbildung, welche

die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (**mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP**) zur Folge hat (Dewson, et al., 2008; George, et al., 2007; Tait und Green, 2010). Die Ceramid-Metaboliten Sphingosin-1-phosphat (S1P) und Hexadecanal wurden als diejenigen Faktoren identifiziert, welche die Oligomerbildung von bax und bak fördern (Chipuk, et al., 2012). Die genaue Funktion der Ceramide zur Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran ist bis jetzt noch nicht vollständig geklärt (Patwardhan, et al., 2016). Es wird angenommen, dass Ceramid mit Unterstützung von Bax direkt an der Porenbildung beteiligt ist (Colombini, 2016; Ganesan, et al., 2010; Lee, et al., 2011; Morad und Cabot, 2013; von Haefen, et al., 2002). Die Expression von bax wird durch das Tumorsuppressorgen p53 gefördert (Miyashita, et al., 1994), dessen Konzentration bei Schädigung der DNA ansteigt (Kastan, et al., 1991). Die Anfälligkeit von Zellen gegenüber apoptotischer Stimuli wird durch das Verhältnis von bcl2 zu bax reguliert (Gazzaniga, et al., 1996; Thomas, et al., 1996). Bei einer Überexpression von bcl-2 werden statt bax-Oligomeren bcl-2/bax-Heterodimere gebildet, welche das Zellüberleben fördern (Oltval, et al., 1993; Yin, et al., 1994).

2.9 Zielstellung der vorliegenden Arbeit

Ceramide sind an einer Vielzahl zellulärer Funktionen beteiligt. Die Beteiligung von Ceramiden an der strahleninduzierten Apoptose wurde bereits in verschiedenen Zellkulturmodellen (Chmura, et al., 1997a; Chmura, et al., 1997b; Haimovitz-Friedman, et al., 1994; Zundel und Giaccia, 1998) und *in vivo* nachgewiesen (Fuks, et al., 1994; Rotolo, et al., 2012; Santana, et al., 1996). Inwiefern apoptotische Prozesse im Epithel der Schleimhäute und in den Endothelien der dazugehörigen Gefäße an der Ausprägung von frühen Strahlenfolgen beteiligt sind, wird kontrovers diskutiert (Brown, 2008; Coderre, 2008; Gudkov und Gleiberman, 2008; Hendry, 2008). Es besteht einerseits die Annahme, dass die Schädigung epithelialer Stammzellen des Gastrointestinaltrakts nach Bestrahlung durch Apoptose des mikrovaskulären Endothels initiiert wird (Paris, et al., 2001; Rotolo, et al., 2012); demgegenüber steht die These, dass das vaskuläre Endothel keinen relevanten Einfluss auf das Überleben epithelialer Stammzellen nach Bestrahlung hat (Coderre, et al., 2008).

In der Literatur wurde eine Modulation der radiogenen *Mucositis enoralis* (Hamsterbackentasche) durch Inhibition der strahleninduzierten Bildung von Ceramiden nach Einzeitbestrahlung (40 Gy) beschrieben (Hwang, et al., 2005). Dabei führte die Behandlung mit Fumonisin B1 zu einer statistisch signifikant geringer ausgeprägten und kürzeren Dauer der Mukositis, verbunden mit einer verminderten Ceramid-Expression. Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Ceramid-Expression wurde auch in der mit Glutathion behandelten Schleimhaut beobachtet. Um die Kontroverse vor allem in Bezug auf die

Entstehung der radiogenen *Mucositis enoralis* zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit geprüft, inwiefern die Inhibition des Sphingomyelin-Signalweges durch Glutathion die Modulation der radiogenen *Mucositis enoralis* beeinflusst. Von besonderem Interesse war dabei die Wirkung von Glutathion in Verbindung mit einer fraktionierten Bestrahlung. Alle Untersuchungen wurden an dem von Dörr etablierten Tiermodell der Zungenunterseite der Maus durchgeführt (Dörr, 1987; Dörr, 1997a). Die Applikation in verschiedenen Zeitintervallen erfolgte in Kombination mit Einzel-, einwöchiger und zweiwöchiger Bestrahlung. Als klinisch relevanter Endpunkt wurden Ulzerationen der Mundschleimhaut quantifiziert, welche einer konfluenten Mukositis Grad 3 nach gängigen Klassifizierungsprotokollen entsprechen. Begleitende histologische Untersuchungen zur Wirkung von Glutathion, aber auch von Fumonisin B1 und Desipramin, dienten der histomorphologischen Beurteilung des Epithels und der Quantifizierung der Zellzahl während zweiwöchiger fraktionierter Bestrahlung in Kombination mit der Hemmung der Ceramidbildung. Veränderungen der Expression von Proteinen, welche an apoptotischen Prozessen beteiligt sind, wurden dabei immunohistochemisch erfasst und ausgewertet.

3 Material und Methoden

Das tierexperimentelle Versuchsvorhaben wurde von der Landesdirektion Dresden als zuständiger Behörde genehmigt (Aktenzeichen 24D-9198.11-1/2010-6). Alle Experimente wurden entsprechend der aktuellen Tierschutzgesetzgebung durchgeführt.

3.1 Versuchstiere

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden männliche und weibliche Mäuse des Inzuchtstammes C3H/Neu aus der Zucht des Experimentellen Zentrums der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden eingesetzt. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere zwischen 9 und 15 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht von mindestens 20 g. Zur Identifizierung erhielten alle Tiere eine individuelle Ohrmarkierung mittels Lochmuster.

Die Mäuse wurden in den Räumen des Experimentellen Zentrums der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten; die getesteten Organismen sind im Anhang (siehe 10.1) aufgelistet. Ein Hell-Dunkel-Rhythmus in den Haltungsräumen wurde durch ein automatisch gesteuertes Lichtprogramm simuliert (Hellphase: 6:30 Uhr bis 18:30 Uhr). Die Temperatur in den klimatisierten Räumen betrug zwischen 22°C und 24°C, die relative Luftfeuchte 50 bis 60 %.

Die Mäuse wurden in Kunststoffkäfigen der Größe 3 (Makrolon®, Fa. Tecniplast Pereg GmbH, Waldkraiburg) mit maximal zehn Tieren pro Käfig gehalten. Als Einstreu wurden Sägespäne verwendet (Ssniff-Bedding $\frac{3}{4}$ Faser, Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Angesäuertes Leitungswasser (Endkonzentration: 4 mM HCl) aus Standard-Trinkflaschen und pelletiertes Mäuse-Standardfutter (Ssniff® R/M-H, 10 mm Pellets autoklavierbar, Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH) standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

3.2 Versuchsdurchführung

3.2.1 Bestrahlungsmethoden

Die Bestrahlungstechniken wurden ursprünglich von Dörr etabliert (Dörr, 1987; Dörr, 1997a) und seither in einer Vielzahl experimenteller Arbeiten angewandt. Die Bestrahlung der Mundschleimhaut erfolgte mit zwei verschiedenen Techniken: perkutane (externe) Bestrahlung der Schnauze und lokale Bestrahlung der Zungenunterseite. Durch die perkutane Bestrahlung wurde nur eine subklinische Schädigung der Zungenschleimhaut induziert. Durch die anschließende lokale Bestrahlung eines Testfeldes auf der Zungenunterseite wurde eine klinisch manifeste Schleimhautreaktion ausgelöst. Letztere Technik fand auch für Einzelbestrahlungen Anwendung.

3.2.1.1 Perkutane Bestrahlung

3.2.1.1.1 Bestrahlungsanlage

Die perkutane (externe) Bestrahlung der Zungenschleimhaut („Schnauzenbestrahlung“) erfolgte mit einer Vollschutz-Röntgenanlage, bestehend aus einem Gehäuse (YXLON Y.MaxiShot, Fa. YXLON International X-Ray GmbH, Hamburg) und einem bipolaren Metall-Keramik-Röntgenstrahler (YXLON.TU 320-D03, Fa. YXLON International X-Ray GmbH, Hamburg). Die Röhrenspannung betrug 200 kV und die Röhrenstromstärke 25 mA. Die Eigenfilterung der Röhre bestand aus einem Berylliumfenster (3 mm) und einem Aluminiumfilter (3 mm), zusätzlich war ein Strahlfilter aus Kupfer (0,6 mm) und Aluminium (1 mm) in das Fenster der Kollimatorplatten (siehe 3.2.1.1.2) eingearbeitet. Im Fokus-Objekt-Abstand (FOA) von 47,0 cm resultierte eine Dosisleistung von ca. 1 Gy/min. Der Strahlengang war vertikal.

3.2.1.1.2 Durchführung

Die externe Bestrahlung erfolgte ohne Narkose der Tiere. Zur Immobilisierung der Mäuse diente eine Kunststoffplatte (30 x 33 x 1,5 cm³), auf der acht Kunststoffröhren (Innendurchmesser 2,8 cm) in zwei parallelen Reihen befestigt waren (Abb. 6). Die Tiere wurden durch die hintere Öffnung in die Röhren verbracht. Konische Bohrungen in einer Plexiglasleiste mit einer Verjüngung von 10 auf 6 mm, welche den vorderen Verschluss der Röhren darstellte, dienten der standardisierten Aufnahme und Fixierung der Schnauzen. Die Atmung der Tiere blieb dabei unbeeinträchtigt. Das Zurückweichen der Mäuse aus der Röhre wurde durch einen rückwärtig unter sanftem Druck eingeführten Styroporstopfen verhindert. Der Stopfen enthielt eine Aussparung zur Aufnahme des Schwanzes. Mit diesem Verfahren

war eine gleichzeitige Bestrahlung von acht Tieren möglich. Eine entsprechende Halterung ermöglichte eine reproduzierbare Positionierung der Kunststoffplatte mit den Tieren im Zentralstrahl der Bestrahlungsanlage.

Zur Abschirmung der Tierkörper diente eine 15 mm dicke Kollimatorplatte aus der Legierung MCP-96 (Werkstatt der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie). In der Platte befand sich zentral ein 18,5 x 5,5 cm großes Fenster, welches den bereits oben beschriebenen Strahlfilter aus Aluminium und Kupfer enthielt. Durch dieses Fenster wurde das Bestrahlungsfeld definiert, welches die Schnauze von der Ebene der Augen bis zur Kehle einschloss und somit die gesamte Zunge umfasste.

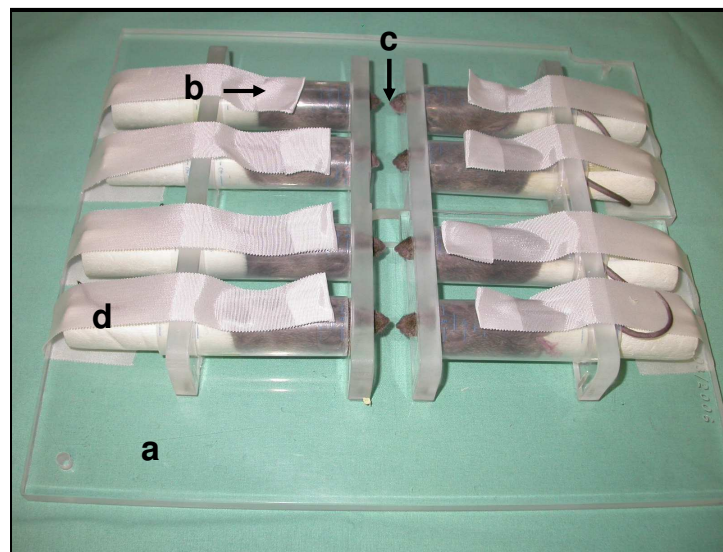


Abb. 6: Fixierung der Tiere für die Schnauzenbestrahlung

Zur Immobilisierung der Tiere während der perkutanen Bestrahlung diente eine rechteckige Kunststoffplatte (a) mit acht Kunststoffröhren (b). Zur Aufnahme der Schnauzen dienten konische Bohrungen (c) in einer Plexiglasleiste, mit der die Röhren an der Vorderseite verschlossen waren. Mit Pflasterstreifen fixierte Styroporstopfen (d) am rückwärtigen Ende der Röhren verhinderten ein Zurückweichen der Tiere.

3.2.1.1.3 Dosimetrie

Die Dosimetrie bei der perkutanen Schnauzenbestrahlung wurde mit einer Ionisationskammer TM31010-1052 mit einem Kammervolumen von 0,125 cm³ durchgeführt. Diese war über einen flexiblen Gummischlauch mit einem Dosimeter UNIDOS 11377 (Fa. PTW, Freiburg) verbunden. Um die Konstanz der Dosisleistung zu gewährleisten, wurde die Messung einmal täglich vor der ersten Bestrahlung durchgeführt. Die Ionisationskammer befand sich dabei in schnauzengleicher Position im Zentralstrahl. Die Dosishomogenität zwischen den einzelnen Bestrahlungspositionen betrug $\pm 5\%$.

Anhand der Dosisleistung wurden die Bestrahlungszeiten für die entsprechenden Dosen berechnet und eingestellt. Die Bestrahlungsanlage schaltete sich nach Ablauf der entsprechenden Zeit automatisch ab. Eine regelmäßige Kontrolle der gesamten Bestrahlungsanlage fand durch Mitarbeiter der Medizinphysik der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie statt.

3.2.1.2 Lokale Zungenbestrahlung (Testbestrahlung)

3.2.1.2.1 Bestrahlungsanlage

Die lokale Bestrahlung wurde ebenfalls mit der bereits unter 3.2.1.1 beschriebenen Bestrahlungsanlage durchgeführt. Die verwendete Röhrenspannung betrug 25 kV, die Röhrenstromstärke 20 mA. Die Filterung erfolgte neben dem Berylliumfenster (3 mm) durch 3,0 mm Aluminium. Der Strahlengang war vertikal. Im Fokus-Objekt-Abstand von 14,5 cm betrug die Dosisleistung 4,3 Gy/min. Eine Darstellung des Versuchsaufbaus zeigt Abb. 7.

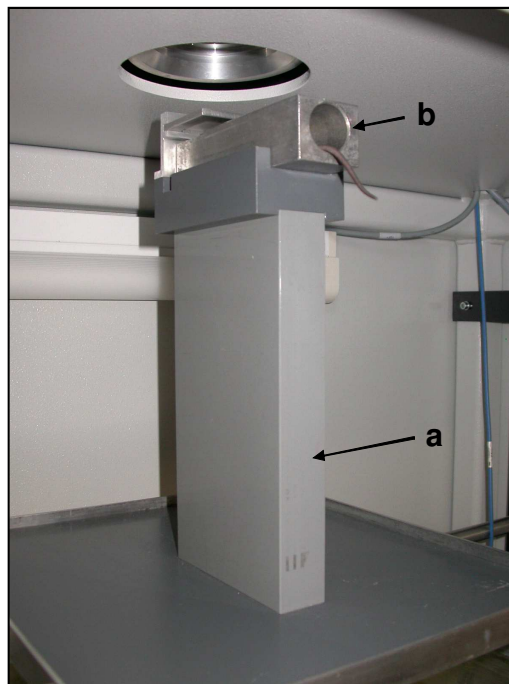


Abb. 7: Bestrahlungsanlage zur lokalen Bestrahlung der Zungenunterseite

Die lokale Bestrahlung wurde mit der Röntgenanlage YXLON Y.TU 320-D03 durchgeführt. Die speziell angefertigte Kunststoffhalterung (a) ermöglichte eine standardisierte Positionierung des Aluminiumblockes (b) mit dem narkotisierten Tier (siehe 3.2.1.2.2) im Zentralstrahl. Der Fokus-Objekt-Abstand (FOA) betrug 14,5 cm.

3.2.1.2.2 Durchführung

Vor der lokalen Bestrahlung wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Fa. Merial GmbH, Hallbergmoos) in einer Dosierung von ca. 60 mg/kg Körpergewicht immobilisiert. Diese Anästhesie dauerte ca. 60 Minuten an. Die Zunge der narkotisierten Tiere wurde mittels einer Pinzette aus der Mundhöhle verlagert. Danach wurden die Tiere in Rückenlage in die zentrale Bohrung (2,5 cm) eines quaderförmigen Aluminiumblocks (13 x 4 x 4 cm³) verbracht (Abb. 8A). Durch eine Bohrung (3 mm) in der Oberseite des Blockes wurde die Zunge mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig nach außen gezogen und – mit der Oberseite dem Block anliegend - mit einem Pflaster an der Zungenspitze fixiert (Abb. 8B). Durch Unterstützung des Kopfes mittels eines Styroporkeils wurde Zug am Zungengrund verhindert, welcher möglicherweise die Blutzirkulation beeinträchtigt hätte. Um ein Auskühlen der Tiere in Folge der Narkose zu vermeiden, wurde der Aluminiumblock mittels handelsüblicher Heizdecken auf 35°C vorgewärmt.

Ein 1 mm dickes Aluminiumplättchen (2 x 4 cm²) mit einem Bestrahlungsfenster von 3 x 3 mm² wurde zentral über der Zungenunterseite befestigt, um Zungenränder und Zungenspitze abzuschirmen. Die um 1 mm erhöhten Seitenränder verhinderten eine Kompression der Zunge. In einer speziellen Halterung (Abb. 7) wurde der Aluminiumblock mit der Maus und einer zusätzlichen Abschirmung (9,5 x 4 cm) aus Blei (1,0 mm) und Aluminium (0,8 mm) unter der Röntgenröhre so positioniert, dass sich das Bestrahlungsfeld im Zentralstrahl befand.

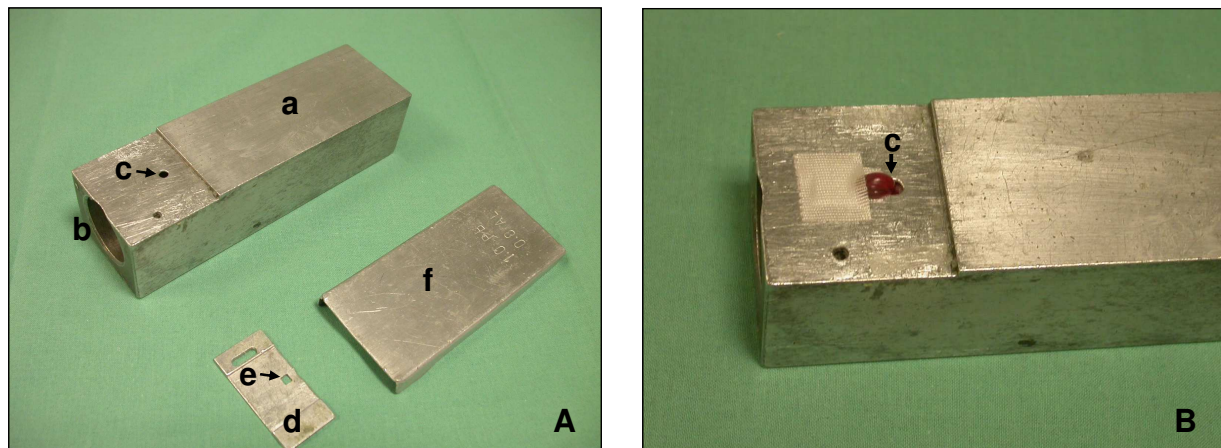


Abb. 8: Lokale Bestrahlung der Zungenunterseite

- (A) Der Aluminiumblock (a) mit zentraler Bohrung (b) diente der Aufnahme und Abschirmung der anästhesierten Tiere. Das Aluminiumplättchen (d) wurde zentral auf die Zunge gelegt, um das Testfeld (e) zu definieren. Eine zusätzliche Abschirmung (f) aus Aluminium wurde auf den Block aufgelegt.
- (B) Die Zunge wurde mit Hilfe einer feinen Pinzette durch die Bohrung (c) im Dach des Aluminiumquaders gezogen und die exponierte Zungenunterseite mit Pflasterstreifen fixiert.

3.2.1.2.3 Dosimetrie

Die Dosimetrie für die lokale Bestrahlung der Zungenunterseite erfolgte mittels einer Ionisationskammer für weiche Röntgenstrahlung vom Typ 23342 mit einem Kammervolumen von $0,02 \text{ cm}^3$, welche mit einem Dosimeter UNIDOS 11377 (alles Fa. PTW) verbunden war. Die Konstanz der Dosisleistung wurde durch entsprechende Messreihen bestätigt, so dass die Dosis durch die Bestrahlungszeit festgelegt werden konnte. Nach Ablauf der eingestellten Zeit schaltete sich die Röntgenanlage automatisch ab. Das Gerät unterlag einer regelmäßigen Kontrolle durch Mitarbeiter der Medizinphysik.

3.2.2 Makroskopische Beurteilung der Strahlenreaktion

Zur Beurteilung der strahleninduzierten Schleimhautreaktion der Zungenunterseite wurde die Zunge ab dem Beginn der ersten makroskopischen Veränderungen bis zur vollständigen klinischen Ausheilung täglich begutachtet. Zur Ruhigstellung der Tiere erfolgte eine Anästhesie mit Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Fa. Merial GmbH, Hallbergmoos) in einer Dosierung von 40 mg/kg. Ohne Berührung des Testfeldes wurde die Zunge vorsichtig mittels einer Pinzette aus der Mundhöhle vorgelagert und unter Kunstlicht mit bloßem Auge beurteilt. Die Strahlenreaktion äußerte sich anfänglich durch eine verstärkte Bildung von Hornschuppen, die zu einer rauen Oberfläche der Zungenunterseite führte. Die Dokumentation dieser verstärkten Desquamation erfolgte in drei Graden (+, ++, +++). Die Bewertung von Ulzerationen und der anschließenden klinischen Reepithelialisierung erfolgte in Form eines Ja/Nein-Schemas. Das Gewicht der Tiere wurde während der gesamten Beobachtungszeit regelmäßig alle zwei Tage kontrolliert und dokumentiert.

3.2.3 Glutathionbehandlung

In der vorliegenden Arbeit wurde L-Glutathion in reduzierter Form (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) verwendet. Eine 10 mM Lösung wurde täglich neu vor Applikation hergestellt, als Lösungsmittel diente sterile isotone Kochsalzlösung. Täglich wurden 100 µl dieser Glutathionlösung, entsprechend 1 µmol, subkutan in die Nackenfalte appliziert. Die Behandlung erfolgte immer vormittags zwischen 10 und 12 Uhr. An den Bestrahlungstagen fand die Gabe 30 bis 60 Minuten nach der Bestrahlung statt. Die Behandlungsschemata sind unter 3.3 beschrieben.

3.3 Beschreibung der Experimente

Eine Übersicht zu den einzelnen Versuchen und den jeweiligen Behandlungsprotokollen gibt Tab. 7. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Bestrahlungsprotokolle, die Applikationsdauer von Glutathion und die lokalen Dosen in allen drei Versuchsreihen: Lokale Einzeitbestrahlung (M1/x), Fraktionierungsversuche über eine Woche (M2/x) und Fraktionierungsprotokolle über zwei Wochen (M3/x). Die Versuche Mx/0 wurden ohne Glutathiongabe durchgeführt. In den Fraktionierungsprotokollen betrug die tägliche Dosis 3 Gy.

Tab. 7: Übersicht über die durchgeführten Versuche

Versuch	Tage der frakt. Bestrahlung	Tag der lokalen Testbestrahlung	Tage der Glutathiongabe*	Testdosen (Gy)
M0	-	-	-	-
M1/0	-	0	-	8; 11; 13; 15; 18
M1/1	-	0	-3/D	8; 11; 13; 15; 18
M1/2	-	0	-3/H	8; 11; 13; 15; 18
M2/0	0-4	7	-	6; 9; 11; 13; 16
M2/1	0-4	7	-3/D	6; 9; 11; 13; 16
M2/2	0-4	7	-3/H	8; 10,5; 12,5; 14,5; 17
M2/3	0-4	7	-3/7	6; 9; 11; 13; 16
M3/0	0-4; 7-11	14	-	5; 8; 10; 12; 15
M3/1	0-4; 7-11	14	-3/14	8; 10,5; 12,5; 14,5; 17
M3/2	0-4; 7-11	14	-3/7	7,5; 10; 12; 14; 16,5
M3/3	0-4; 7-11	14	-3/D	8; 11; 13; 15; 18
M3/4	0-4; 7-11	14	-3/H	8; 11; 13; 15; 18
M3/5	0-4; 7-11	14	7/14	8; 11; 13; 15; 18

* in Bezug zur Einzeit- bzw. ersten fraktionierten Bestrahlung an Tag 0;
D: erste Diagnose der Ulzera; H: Heilung aller Ulzera

3.3.1 Lokale Einzeitbestrahlung (Versuche M1/x)

Die Versuche M1/x umfassten die alleinige lokale Einzeitbestrahlung der Zungenunterseite. Der Kontrollversuch M1/0 ohne Glutathiongabe wurde zur Charakterisierung der Reaktion der Mundschleimhaut nach einer einzelnen lokalen Strahlenexposition durchgeführt. Es wurden Dosisabhängigkeit und zeitlicher Verlauf der Reaktion erfasst. Die Bestrahlung erfolgte in fünf gestaffelten Dosisgruppen mit je zehn Tieren. Die Einzeitbestrahlung wurde zwischen 9 und 15 Uhr durchgeführt.

Die Applikation von Glutathion erfolgte im Versuch M1/1 von Tag -3 bis zur Erstdiagnose ulzerativer Läsionen, im Versuch M1/2 von Tag -3 bis zur vollständigen Heilung. Die Behandlung von Tieren ohne ulzerative Läsionen erfolgte maximal bis zum letzten Tag, an

dem Ulzera neu diagnostiziert wurden (Versuch M1/1) bzw. bis zu dem Tag, an dem alle vorkommenden Ulzera vollständig makroskopisch abgeheilt waren (Versuch M1/2).

3.3.2 Alleinige Applikation von Glutathion (Versuch M/0)

Um die Wirkung einer alleinigen Applikation von Glutathion auf die Mundschleimhaut und das Allgemeinbefinden der Tiere zu erfassen, wurde fünf Tieren über einen Zeitraum von 28 Tagen täglich 1 µmol Glutathion injiziert. Die Zunge wurde in diesem Zeitraum täglich auf Veränderungen der Zungenunterseite untersucht, weiterhin wurde alle zwei Tage das Gewicht der Tiere kontrolliert und dokumentiert.

3.3.3 Fraktionierte Bestrahlung

3.3.3.1 Bestrahlung mit 5 x 3 Gy, gefolgt von lokaler Testbestrahlung (Versuch M2/x)

In der Versuchsreihe M2/x erfolgte die fraktionierte Bestrahlung der Schnauze an fünf aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0-4) mit je 3 Gy. An Tag 7 erfolgte eine lokale Testbestrahlung mit gestaffelten Testdosen (fünf Dosisgruppen, zehn Tiere). Der Versuch M2/0 diente als Kontrollversuch ohne Glutathiongabe. In Versuch M2/1 wurde die tägliche Applikation von Glutathion von Tag -3 bis zur Erstdiagnose ulzerativer Läsionen, in Versuch M2/2 von Tag -3 bis zur vollständigen Heilung der Ulzera vorgenommen. Die Behandlung von Tieren ohne Ulkus erfolgte analog zu M1/1 bzw. M1/2. In Versuch M2/3 wurde Glutathion von Tag -3 bis Tag 7 appliziert. Die perkutane Bestrahlung wurde täglich zwischen 10 und 12 Uhr, die abschließende lokale Bestrahlung der Zunge zwischen 9 und 15 Uhr durchgeführt.

3.3.3.2 Bestrahlung mit 10 x 3 Gy, gefolgt von lokaler Testbestrahlung (Versuche M3/x)

In der Versuchsreihe M3/x erfolgte eine Bestrahlung mit zehn Fraktionen zu je 3 Gy (Tag 0-4, Tag 7-11) über zwei Wochen mit einem bestrahlungsfreien Wochenende. Die lokale Bestrahlung der Zungenunterseite mit fünf Dosisgruppen (je zehn Tiere) fand an Tag 14 statt. Versuch M3/0 diente als Kontrollversuch ohne Glutathiongabe. Die Behandlung mit Glutathion wurde bei Versuch M3/1 von Tag -3 bis Tag 7, bei Versuch M3/2 von Tag -3 bis Tag 14 vorgenommen. In den Versuchen M3/3 und M3/4 wurde die Applikation von Tag -3 bis zur Erstdiagnose ulzerativer Läsionen bzw. bis zur vollständigen Heilung der Ulzera durchgeführt; hier erfolgte die Behandlung von Tieren ohne Ulkus analog zu M1/1 bzw. M1/2.

Die Behandlung der Tiere in Versuch M3/5 wurde von Tag 7 bis Tag 14 vorgenommen. Die perkutane Bestrahlung wurde täglich zwischen 10 und 12 Uhr, die abschließende lokale Bestrahlung der Zunge zwischen 9 und 15 Uhr durchgeführt.

3.4 Histologische Untersuchungen (Versuche H/x)

3.4.1 Bestrahlungsprotokoll

Für die histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Schnauzen von 75 Mäusen über maximal zwei Wochen mit 5 x 3 Gy/Woche bestrahlt (Versuch H1). In diesem Versuch wurde den Tieren täglich ab Tag -3 bis Tag 24 je 1 µmol Glutathion subkutan appliziert. Die Entnahme von jeweils fünf Zungen erfolgte umtäglich von Tag -3 bis Tag 25.

Die Versuche H0 (Kontrolle, alleinige Bestrahlung), H2 (Fumonisin B1, 0,2 nmol/Tag, subkutan, Tag -3 bis 24) und H3 (Desipramin, 1 nmol/Tag, subkutan, Tag -3 bis 24) wurden nicht von der Autorin dieser Arbeit durchgeführt. Die Versuche H0 und H2 erfolgten im Rahmen der vorangegangenen Dissertationen von C. Mey (Diss. med. dent., TU Dresden; in Vorbereitung) und H3 von V. Limpert (Limpert, 2014). Dabei waren Techniken und Versuchsdurchführung analog zu Versuch H1.

3.4.2 Zungenentnahme und Fixierung

Unmittelbar nach dem Töten der Tiere durch zervikale Dislokation erfolgte die Zungenentnahme. Dabei wurde der bewegliche Teil der Zunge mit einer Schere am Zungengrund abgetrennt. Die Fixation der Zungen erfolgte für mindestens zwölf Stunden in neutral gepuffertem Formalin. Anschließend wurden die Zungen median mit einem Skalpell geteilt. Danach erfolgte die Dehydrierung der Präparate mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Hypercenter XP, Shandon GmbH, Frankfurt a.M.) und die abschließende Einbettung in Paraffin. Die Anfertigung von Zungenschnitten mit einer Dicke von 3 µm erfolgte mit einem Rotationsmikrotom (JUNG 2065 Supercut, Fa. Reichert-Jung, Nussloch).

3.4.3 Hämatoxilin-Eosin-Färbung

Von jeder Zunge wurde jeweils ein Schnitt mit Hämatoxilin und Eosin gefärbt (siehe 10.2.3). Eine Auflistung der einzelnen Färbeschritte ist in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Protokoll HE-Färbung

Dauer	Arbeitsschritt
3 x 10	Xylol
je 1 min	absteigende Alkoholreihe
1 min	Aqua dest.
17 min	Mayers Hämalaun
5 min	fließendes Leitungswasser
8 min	0,5 % Eosinlösung
2 x kurz tauchen	Ethanol 96 %
2 x kurz tauchen	Ethanol absolutus
2 x 5 min	Xylol
	eindecken mit Entellan

3.4.4 Immunhistochemische Färbungen

3.4.4.1 Ki-67 (TEC-3)

Zur Detektion des Proliferationsmarkers Ki-67 wurde der monoklonale Antikörper TEC-3 (monoclonal rat anti mouse Ki-67 Antigen, Clone TEC-3, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) verwendet. Der Primärantikörper wurde mit einem anti-Ratte Sekundärantikörper markiert, detektiert wurde mit der Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Methode und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Die verwendeten Reagenzien sind im Anhang (siehe 10.2.5) aufgelistet. Das Färbeprotokoll fasst Tab. 9 zusammen.

Die Schnitte wurden in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Eine Demaskierung der Antigene wurde durch zehnminütiges Kochen der Schnitte in einem Citratpuffer in der Mikrowelle (630 W) erreicht. Danach wurden die Schnitte auf Eis abgekühlt, mit PBS gespült und zur Hemmung der endogenen Peroxidase für 10 Minuten mit 3 %iger Wasserstoffperoxidlösung inkubiert. Die Inkubation mit 5 %igem Normalserum vom Kaninchen diente der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Im nachfolgenden Schritt wurde der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung aufgetragen. Als Negativkontrolle für die Färbung diente ein Normal-IgG der Ratte, dessen Verdünnung dem IgG-Gehalt des Ki-67-Antikörpers angepasst wurde. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte für 24 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper und dem ABC-Komplex wurde mit DAB detektiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte mit Hämalaun. Die Schnitte wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert und mit Entellan eingedeckt.

Tab. 9: Färbeprotokoll für Ki-67

Dauer	Arbeitsschritte
3 x 10 min	Xylol
je 3 min	absteigende Alkoholreihe
5 min	PBS
10 min	in kochendem Citratpuffer (Mikrowelle, 630 W)
30 min	auf Eis in Citratpuffer abkühlen
5 min	waschen mit PBS
10 min	3 % H ₂ O ₂
5 min	waschen mit PBS
15 min	1,5 % Normalserum (Kaninchen), (37°C feuchte Kammer)
	Normalserum abklopfen
24 h	Primärantikörper 1:50 (RT, feuchte Kammer)
3 x 5 min	waschen mit PBS
30 min	Sekundärantikörper 1:200 (RT, feuchte Kammer)
3 x 5 min	waschen mit PBS
30 min	ABC-Komplex (RT, feuchte Kammer)
3 x 5 min	waschen mit PBS
5 min	DAB
	mit A.dest kurz spülen
5 min	waschen mit A.dest
30 sek	Hämalaun
	mit Leitungswasser kurz spülen
5 min	in Leitungswasser bläuen
je 3 min	aufsteigende Alkoholreihe
2 x 5 min	Xylol, mit Entellan eindecken

3.4.4.2 Aktivierte Caspase-3

Die Färbung der aktivierten Caspase-3 erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper (rabbit polyclonal, cleaved Caspase-3 [#9661S], Fa. CellSignaling, Danvers, USA). Der Primärantikörper wurde mit einem anti-Kaninchen Sekundärantikörper markiert, detektiert wurde mit der Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Methode und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Alle verwendeten Reagenzien sind im Anhang (siehe 10.2.4) aufgelistet. Das Färbeprotokoll ist in Tab. 10 zusammengefasst.

Wie schon unter 3.4.4.1 beschrieben, wurden die Schnitte entparaffiniert, rehydriert und demaskiert. Nach dem Abkühlen und Waschen der Schnitte wurde mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers ein polyklonaler Kaninchen-IgG-Antikörper aufgetragen. Danach folgten Inkubationen mit dem Sekundärantikörper und dem ABC-Komplex. Nach der Detektion mit DAB wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckt.

Tab. 10: Färbeprotokoll für aktivierte Caspase-3

Dauer	Arbeitsschritte
3 x 10 min	Xylol
je 3 min	absteigende Alkoholreihe
5 min	PBS
10 min	in kochendem Citratpuffer (Mikrowelle, 630 W)
30 min	auf Eis in Citratpuffer abkühlen
5 min	waschen mit PBS
10 min	3 % H ₂ O ₂
5 min	waschen mit PBS
15 min	1,5 % Normalserum (Kaninchen), (37°C feuchte Kammer)
	Normalserum abklopfen
24 h	Primärantikörper 1:50 (RT, feuchte Kammer)
3 x 5 min	waschen mit PBS
30 min	Sekundärantikörper 1:200 (RT, feuchte Kammer)
3 x 5 min	waschen mit PBS
30 min	ABC-Komplex (RT, feuchte Kammer)
3 x 5 min	waschen mit PBS
5 min	DAB
	mit A.dest kurz spülen
5 min	waschen mit A.dest
30 sek	Hämalaun
	mit Leitungswasser kurz spülen
5 min	in Leitungswasser bläuen
je 3 min	aufsteigende Alkoholreihe
2 x 5 min	Xylol, mit Entellan eindecken

3.4.4.3 Neutrale Sphingomyelinase (n-SMase)

Der immunhistochemische Nachweis der neutralen Sphingomyelinase (EC 3.1.4.12) erfolgte mit dem Antikörper n-SMase (mouse monoclonal n-SMase [B-1], # sc-377135; Fa. Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg). Um unspezifische Bindungen des anti-Maus Sekundärantikörpers an den murinen Gewebeschnitten zu verhindern, wurde der Primärantikörper direkt biotinyliert (Animal Research Kit, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark). Das Maus-Normalserum zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde dem Ansatz von Primärantikörper und Biotin zugegeben. Die Detektion erfolgte mittels Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Methode und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Die verwendeten Reagenzien sind im Anhang (siehe 10.2.8) aufgelistet. Das Färbeprotokoll fasst Tab. 11 zusammen.

Die Schnitte wurden entparaffiniert, rehydriert und demaskiert. Nach dem Abkühlen und Waschen der Schnitte wurde der biotinylierte Primärantikörper für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers Normal-IgG der Maus aufgetragen. Anschließend erfolgte nach dem Waschen die Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase-Komplex für 15 Minuten. Nach der Detektion mit DAB wurde mit Häkalaun gegengefärbt. Danach wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckt.

Tab. 11: Färbeprotokoll für neutrale Sphingomyelinase¹

Dauer	Arbeitsschritte
3 x 10 min	Xylol
je 3 min	absteigende Alkoholreihe
5 min	PBS
15 min	in kochendem Citratpuffer (Mikrowelle, 630 W)
30 min	auf Eis in Citratpuffer abkühlen
5 min	waschen mit PBS
5 min	0,3 % H ₂ O ₂
5 min	waschen mit PBS
15 min	biotinylierter Primär-Antikörper (bei RT) 1:300
3 x 5 min	waschen mit PBS
15 min	Streptavidin-Peroxidase-Komplex
3 x 5 min	waschen mit PBS
5 min	DAB
	mit A.dest kurz spülen
5 min	waschen mit A.dest
30 sek	Häkalaun
	mit Leitungswasser kurz spülen
5 min	in Leitungswasser bläuen
je 3 min	aufsteigende Alkoholreihe
2 x 5 min	Xylol, mit Entellan eindecken

3.4.4.4 Ceramid

Die Detektion des epithelialen Ceramids erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper (Ceramide, monoclonal mouse IgM Antibody [MID 15B4]; Enzo Life Sciences, Lörrach). Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des anti-Maus Sekundärantikörpers an den murinen Gewebeschnitten wurde der Primärantikörper direkt biotinyliert (Animal Research Kit, Fa. Dako, Glostrup, Dänemark). Das Maus-Normalserum zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurde dem Ansatz von Primärantikörper und Biotin zugegeben. Die Detektion erfolgte mittels Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Methode und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Die verwendeten Reagenzien sind im Anhang (siehe 10.2.9) aufgelistet. Das Färbeprotokoll fasst Tab. 12 zusammen.

Die Schnitte wurden entparaffiniert, rehydriert und demaskiert. Nach dem Abkühlen und Waschen der Schnitte wurde der biotinylierte Primärantikörper für 15 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Für die Negativkontrolle wurde anstelle des Primärantikörpers Normal-IgM der Maus aufgetragen. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex für 15 Minuten. Nach der Detektion mit DAB wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckt.

Tab. 12: Färbeprotokoll für Ceramid

Dauer	Arbeitsschritte
3 x 10 min	Xylol
je 3 min	absteigende Alkoholreihe
5 min	PBS
10 min	in kochendem Citratpuffer (Mikrowelle, 630 W)
30 min	auf Eis in Citratpuffer abkühlen
5 min	waschen mit PBS
5 min	0,3 % H ₂ O ₂
5 min	waschen mit TBS-T
15 min	biotinylierter Primär-Antikörper (bei RT) 1:50
3 x 5 min	waschen mit TBS-T
15 min	Streptavidin-Peroxidase-Komplex
3 x 5 min	waschen mit TBS-T
5 min	DAB
	mit A.dest kurz spülen
5 min	waschen mit A.dest
30 sek	Hämalaun
	mit Leitungswasser kurz spülen
5 min	in Leitungswasser bläuen
je 3 min	aufsteigende Alkoholreihe
2 x 5 min	Xylol, mit Entellan eindecken

3.4.4.5 CD31

Die immunhistochemische Färbung von Endothelzellen erfolgte mit einem gegen das endotheliale Antigen CD31 gerichteten Antikörper (rabbit polyclonal PECAM-1[M-20], # sc-1506-R; Fa. Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg). Die Markierung des Primärantikörpers erfolgte mit einem anti-Kaninchen Sekundärantikörper, detektiert wurde mit der Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Methode und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Die verwendeten Reagenzien sind ebenfalls im Anhang (siehe 10.2.10) aufgelistet. Das Protokoll der Färbung zeigt Tab. 13.

Nachdem die Schnitte entparaffiniert, rehydriert, demaskiert und gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Als IgG-Isotypkontrolle diente Normal-IgG des Kaninchens. Danach folgten Inkubationen mit dem Sekundärantikörper und dem ABC-Komplex. Nach der Detektion mit DAB wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckt.

Tab. 13: Färbeprotokoll für CD31

Dauer	Arbeitsschritte
3 x 10 min	Xylol
je 3 min	absteigende Alkoholreihe
5 min	PBS
10 min	in kochendem Citratpuffer (Mikrowelle, 630 W)
30 min	auf Eis in Citratpuffer abkühlen
5 min	waschen mit PBS
10 min	3 % H ₂ O ₂
5 min	waschen mit PBS
1 h	Blockierlösung (3% goat serum in PBS)
über Nacht	Primärantikörper (1:2500)
3 x 5 min	waschen mit PBS
1 h	Sekundärantikörper (1:200)
3 x 5 min	waschen mit PBS
30 min	ABC
3 x 5 min	waschen mit PBS
5 min	DAB
	mit A.dest kurz spülen
5 min	waschen mit A.dest
30 sek	Hämalaun
	mit Leitungswasser kurz spülen
5 min	in Leitungswasser bläuen
je 3min	aufsteigende Alkoholreihe
2 x 5 min	Xylol, mit Entellan eindecken

3.4.4.6 Bcl-2

Der immunhistochemische Nachweis von Bcl-2 erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper (goat polyclonal Bcl-2 (N-19), # sc-492; Fa. Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg). Die Markierung des Primärantikörpers erfolgte mit einem anti-Ziege Sekundärantikörper, detektiert wurde mit der Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Methode und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Die verwendeten Reagenzien sind ebenfalls im Anhang (siehe 10.2.6) aufgelistet. Das Protokoll der Färbung zeigt Tab. 14.

Nachdem die Schnitte entparaffiniert, rehydriert, demaskiert und gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Als IgG Isotypkontrolle diente Normal-IgG der Ziege. Danach folgten Inkubationen mit dem Sekundärantikörper und dem ABC-Komplex. Nach der Detektion mit DAB wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckt.

Tab. 14: Färbeprotokoll für Bcl-2

Dauer	Arbeitsschritte
3 x 10 min	Xylol
je 3 min	absteigende Alkoholreihe
5 min	PBS
10 min	in kochenden Citratpuffer (Mikrowelle, 630 W)
30 min	auf Eis in Citratpuffer abkühlen
5 min	waschen mit PBS
5 min	3 % H ₂ O ₂
5 min	waschen mit TBS-T
10 min	Blockierlösung (5% rabbit serum in PBS)
1 Stunde	Primärantikörper (1:400)
3 x 5 min	waschen mit TBS-T
1 h	Sekundärantikörper (1:200)
3 x 5 min	waschen mit TBS-T
45 min	ABC
3 x 5 min	waschen mit TBS-T
5 min	DAB
	mit A.dest kurz spülen
5 min	waschen mit A.dest
30 sek	Hämalaun
	mit Leitungswasser kurz spülen
5 min	in Leitungswasser bläuen
je 3 min	aufsteigende Alkoholreihe
2 x 5 min	Xylol, mit Entellan eindecken

3.4.4.7 Bax

Der immunhistochemische Nachweis von Bax erfolgte mit einem polyklonalen Antikörper (rabbit polyclonal Bax (P-19), # sc-526; Fa. Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg). Die Markierung des Primärantikörpers erfolgte mit einem anti-Kaninchen Sekundärantikörper, detektiert wurde mit der Avidin-Biotin-Komplex-Peroxidase-Methode und 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Die verwendeten Reagenzien sind ebenfalls im Anhang (siehe 10.2.7) aufgelistet. Das Protokoll der Färbung zeigt Tab. 15.

Nachdem die Schnitte entparaffiniert, rehydriert, demaskiert und gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Als IgG-Isotypkontrolle diente Normal-IgG des Kaninchens. Danach folgten Inkubationen mit dem Sekundärantikörper und dem ABC-Komplex. Nach der Detektion mit DAB wurde mit Hämalaun gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckt.

Tab. 15: Färbeprotokoll für Bax

Dauer	Arbeitsschritte
3 x 10 min	Xylol
je 3 min	absteigende Alkoholreihe
5 min	PBS
10 min	in kochenden Citratpuffer (Mikrowelle, 630 W)
30 min	auf Eis in Citratpuffer abkühlen
5 min	spülen mit PBS
10 min	3 % H ₂ O ₂
3 x 5 min	waschen mit TBS-T
1 h	Blockierlösung (5% goat serum in TBS)
über Nacht	1. AK (1:400)
3 x 5 min	waschen mit TBS-T
1 h	2. AK (1:200)
3 x 5 min	waschen mit TBS-T
30 min	ABC
3 x 5 min	waschen mit TBS-T
5 min	DAB
	mit A.dest kurz spülen
5 min	waschen mit A.dest
30 sek	Hämalaun
	mit Leitungswasser kurz spülen
5 min	in Leitungswasser bläuen
je 3 min	aufsteigende Alkoholreihe
2 x 5 min	Xylol, mit Entellan eindecken

3.4.5 Auswertung der Schnitte

Die HE-gefärbten Schnitte wurden bei 400facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop (Axioplan, Fa. Zeiss, Jena) ausgewertet. Dafür wurde ein quadratisches Zählraster, welches in 4 x 4 kleinere Quadrate (Seitenlänge pro Quadrat: 50 µm) unterteilt war, verwendet. Die fotografische Dokumentation der Färbungen erfolgte mit dem Axio Imager.M1 (Fa. Zeiss, Jena).

Es wurden mindestens 2 mm der Zungenunterseite ab dem Übergang des papillentragenden zum papillenfreien Epithel bis zum Zungengrund ausgewertet. Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die Anzahl der kernhaltigen Zellen in der Germinativ- und Funktionsschicht ermittelt. Gezählt wurde je Längeneinheit Epithel, ohne Berücksichtigung von Undulationen der Basalmembran. Die Dicken der Germinativ-, Funktions- und Keratinschicht wurden mit Hilfe des Zählrasters gemessen; dies erfolgte jeweils am 2., 5. und 8. Raster ab dem Übergang zum papillenfreien Epithel. Für die Beurteilung der immunhistochemischen Färbungen wurden alle braun bis bräunlich gefärbten Zellen des Epithels der Zungenunterseite als positiv gewertet. Die Auswertung des Apoptosemarkers Caspase-3 erfolgte zusätzlich auch im Gefäßendothel der Zunge.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistical Analysis System (SAS), Version 9.1.3 (SAS, 1990).

3.5.1 Dosis-Effekt-Analysen

Die Analyse der Beziehung zwischen Dosis und Ulkusfrequenz wurde mittels Probit-Analyse (Gogolok, et al., 1992; SAS, 1990) unter Annahme einer logarithmischen Verteilungsfunktion (Logit-Analyse), ohne Vorgabe eines Schwellenwertes, durchgeführt. Dies ergab sigmoide Dosis-Effekt-Kurven. Die ED_{50} als ein charakteristischer Wert dieser Kurve beschreibt diejenige Strahlendosis, bei der bei 50 % der Versuchstiere eine Ulzeration zu erwarten ist. Als Maß für die statistische Streuung der ED_{50} dienten die Standardabweichung σ und der 95 %ige Vertrauensbereich der ED_{50} .

Zum statistischen Vergleich von Dosis-Effekt-Kurven diente eine Maximum-Likelihood-Analyse auf Basis des Logit-Modells unter Verwendung des Likelihood-Ratio-Tests (SAS, 1990). Als statistisch signifikanter Unterschied wurde ein p-Wert $< 0,05$ definiert.

In Fällen, in denen eine Dosisabhängigkeit der Reaktion mittels Probit-Analyse nicht möglich war (kein oder nur ein Datenpunkt mit einer Inzidenz zwischen 0 % und 100 %), wurde mittels Cochran-Armitage-Trend-Test geprüft, ob es einen monotonen Trend im Auftreten der Häufigkeit von Ulzerationen gibt (SAS PROC FREQ) (Gogolok, et al., 1992; Somers, 1962).

Die aus dieser Methode resultierenden p-Werte für die Dosisabhängigkeit sind im Text entsprechend gekennzeichnet.

3.5.2 Zeitlicher Verlauf der Strahlenreaktion

Zur Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Strahlenreaktion dienten die Parameter Latenzzeit und Ulkusdauer. Die Latenzzeit beschreibt den Zeitraum zwischen Testbestrahlung bzw. Einzeitbestrahlung und der Erstdiagnose einer Ulzeration. Die Zeitspanne zwischen Erstdiagnose und makroskopischer Ausheilung der Ulzeration (Reepitelialisierung) wurde als Ulkusdauer definiert. Es wurden von beiden Parametern der arithmetische Mittelwert sowie die Standardabweichung (SD) für alle Reagenten einer Dosisgruppe bzw. eines Versuchs berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte gegebenenfalls mittels T-Test.

3.5.3 Histologische Untersuchungen

Für Zellzahlen und Schichtdicken erfolgte die Berechnung des arithmetischen Mittelwertes sowie des Standardfehlers (SEM) für jedes Tier und daraus für jede Versuchsgruppe von je fünf Tieren. Die Werte für die Zelldichte wurden auf 1 mm Epithellänge normiert.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen erfolgte durch Berechnung des prozentualen Anteils positiver Zellen (Markierungsindex), wofür die absolute Anzahl spezifisch gefärbter Zellen in das Verhältnis zur Gesamtzellzahl des Epithels der Zungenunterseite gesetzt wurde.

Aufgrund der geringen Gruppengröße von fünf Tieren pro Datenpunkt wurde auf eine eingehende statistische Testung verzichtet. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf eine beschreibende Darstellung des Verlaufs der Einzelparameter über den Gesamtzeitraum.

4 Ergebnisse

4.1 Alleinige Applikation von Glutathion

Um Veränderungen an der Mundschleimhaut durch die alleinige systemische Gabe von Glutathion auszuschließen, wurden fünf Tiere über einen Zeitraum von 28 Tagen täglich mit Glutathion (1 $\mu\text{mol}/\text{Inj.}$) behandelt. Die Zunge der Tiere wurde täglich auf etwaige Veränderungen untersucht sowie umtägig das Gewicht gemessen und dokumentiert. Während des gesamten Zeitraums wurden keine Veränderungen der Mundschleimhaut festgestellt. Allgemeinzustand und Verhalten der Tiere waren unbeeinträchtigt. Die maximale Gewichtsabnahme betrug 10,5 % an Tag 8. Eine graphische Darstellung der Gewichtsverläufe der einzelnen Tiere zeigt Abb. 9.

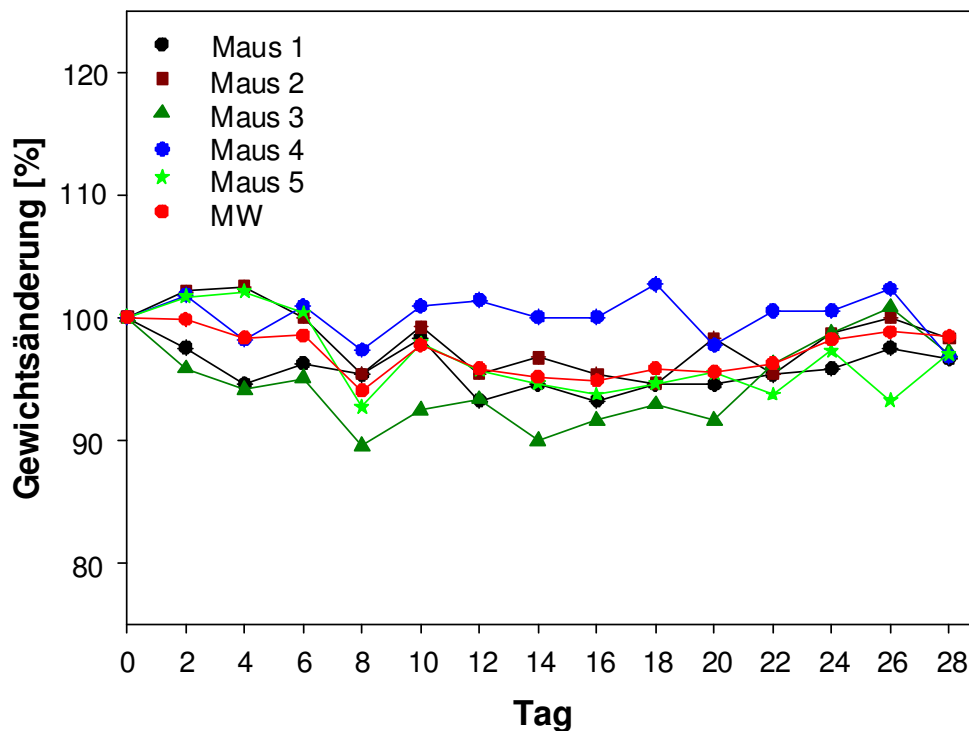


Abb. 9: Gewichtsverlauf während Glutathionbehandlung über 28 Tage

Dargestellt ist die individuelle Gewichtsänderung von fünf Tieren, bezogen auf das Ausgangsgewicht an Tag 0.

4.2 Klinische Veränderungen der Mundschleimhaut nach Einzeitbestrahlung

4.2.1 Lokale Einzeitbestrahlung (Versuch M1/0)

Versuch M1/0 diente der grundsätzlichen Charakterisierung der Strahlenreaktion der Zungenschleimhaut und somit zur Kontrolle für alle weiteren Versuche.

Sechs bis sieben Tage nach der lokalen Einzeitbestrahlung traten die ersten klinischen Veränderungen dosisunabhängig in Form von Rötung und Schwellung an der Zungenunterseite auf. Nach weiteren zwei bis drei Tagen folgte ein zunehmend raues Erscheinungsbild der Zungenoberfläche, typisch für eine vermehrte epitheliale Desquamation. Aus dieser Phase entwickelte sich innerhalb weiterer zwei bis drei Tage eine ulzerative Läsion, welche von einer weißlich schimmernden Pseudomembran bedeckt war (Abb. 10). Aus jeder dieser beschriebenen Phasen war eine Heilung möglich. Die Reepithelialisierung der Ulzerationen erfolgte nach durchschnittlich drei Tagen.



Abb. 10: Ulzerative Läsion der Zungenunterseite

Klinisches Bild einer Ulzeration im Bestrahlungsfeld auf der Zungenunterseite, 13 Tage nach lokaler Einzeitbestrahlung (18 Gy) des Testfeldes auf der Zungenunterseite

4.2.2 Dosisabhängigkeit der Ulkusfrequenz

Die Dosis-Effekt-Kurve für die Ulkusinzidenz nach lokaler Einzeitbestrahlung war steil und gut definiert (Abb. 11). Die ED_{50} betrug $13,0 \pm 0,7$ Gy mit einem 95 %igen Vertrauensbereich von $12,1 - 14,0$ Gy. Die Dosisabhängigkeit der Ulkusfrequenz war signifikant ($p < 0,005$).

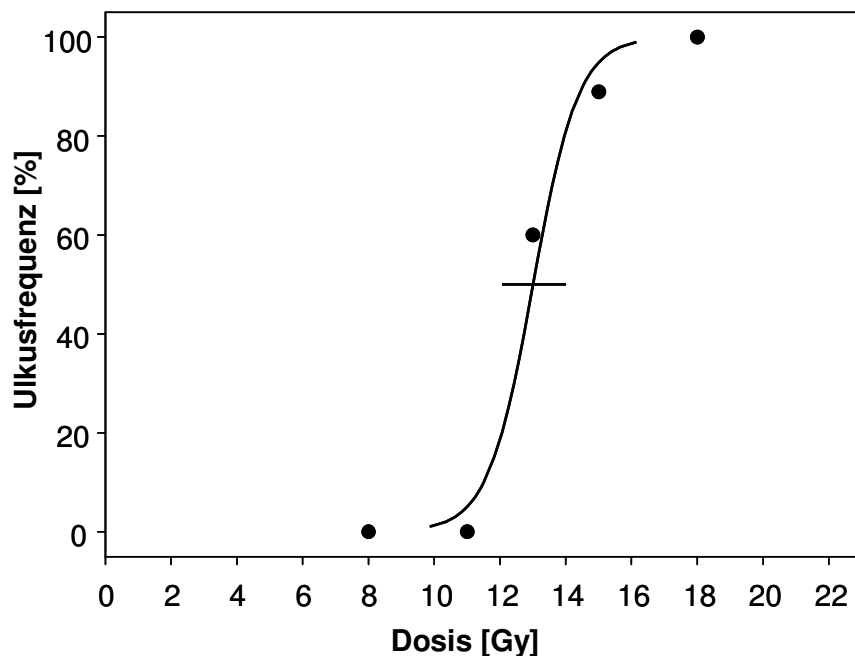


Abb. 11: Dosisabhängigkeit der Ulkusfrequenz nach Einzeitbestrahlung (Versuch M1/0)

Die Abbildung zeigt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Ulzerationen in Abhängigkeit von der Dosis (Gy). Die beobachteten Ulkusfrequenzen sind als Punkte dargestellt. Die ED_{50} betrug $13,0 \pm 0,7$ Gy. Der Fehlerbalken stellt das 95 %-Konfidenzintervall der ED_{50} dar.

4.2.3 Zeitlicher Verlauf

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse des zeitlichen Verlaufs der Strahlenreaktion in Versuch M1/0 sind in Tab. 16 zusammengefasst.

Tab. 16: Ergebnisse der lokalen Einzeitbestrahlung (Versuch M1/0)

Dosis [Gy]	Anzahl der Reagenten	Mittlere Latenzzeit SD [d]	Mittlere Ulkusdauer SD [d]
8,0	0	-	-
11,0	0	-	-
13,0	6	$13,2 \pm 0,4$	$3,2 \pm 0,8$
15,0	8	$12,4 \pm 0,9$	$3,8 \pm 0,7$
18,0	10	$12,2 \pm 0,9$	$3,6 \pm 1,1$
Gesamt	24	$12,5 \pm 0,9$	$3,6 \pm 0,9$

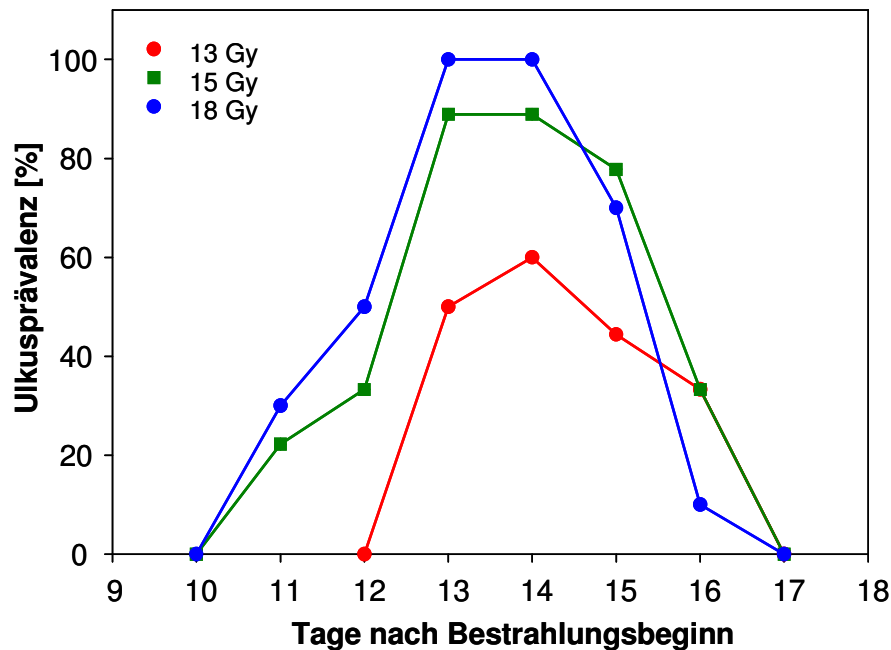


Abb. 12: Ulkusprävalenz nach Einzeitbestrahlung (Versuch M1/0)

Dargestellt ist die Ulkusprävalenz nach lokaler Einzeitbestrahlung (8 - 18 Gy). Ulzerationen traten ab Tag 11 auf. Das Maximum der Reagenten in den einzelnen Dosisgruppen wurde an den Tagen 13 und/ oder 14 beobachtet. Ab Tag 17 waren alle Ulzerationen reepithelialisiert. Nach Bestrahlung der Gruppen mit den Dosen 8 Gy und 11 Gy wurden keine Ulzerationen festgestellt.

Die Prävalenz der Ulzerationen nach lokaler Einzeitbestrahlung ist in Abb. 12 dargestellt. Die beiden niedrigsten Dosisgruppen (8 Gy, 11 Gy) zeigten keine Ulzerationen. Die ersten Ulzerationen in den höheren Dosisgruppen traten ab Tag 11 auf. Die maximale Prävalenz zeigte sich an Tag 14 mit insgesamt 24 Reagenten. Die Reepithelialisierung aller Ulzerationen war an Tag 17 abgeschlossen. Die durchschnittliche Latenzzeit betrug $12,5 \pm 0,9$ Tage (Abb. 13; Tab. 16). Die Latenz zeigte einen Trend für die Abhängigkeit von der Strahlendosis ($p = 0,0530$). Die Ulzerationen dauerten im Durchschnitt $3,6 \pm 0,9$ Tage an. Die Dauer war unabhängig von der Strahlendosis ($p = 0,5977$).

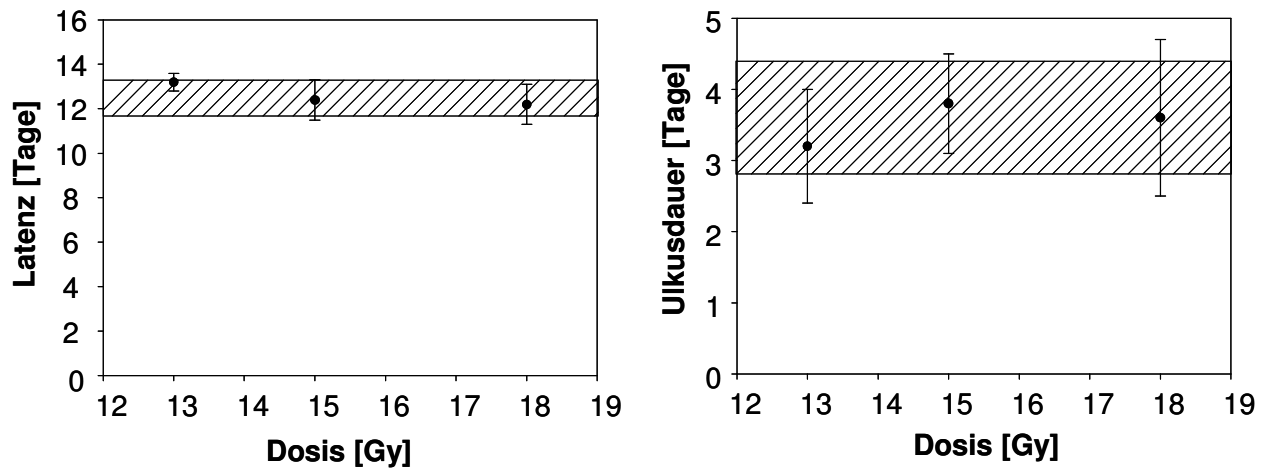


Abb. 13: Latenzzeit (links) und Ulkusdauer (rechts) in Abhängigkeit von der Strahlendosis nach Einzelbestrahlung (Versuch M1/0)

Die Latenzzeit der Ulzerationen ($MW \pm SD$) zeigte einen Trend zur Abhängigkeit von der Strahlendosis ($p = 0,0530$). Die durchschnittliche Ulkuslatenz betrug $12,5 \pm 0,8$ Tage (schraffierter Bereich). Die Ulkusdauer ($MW \pm SD$) war unabhängig von der Strahlendosis ($p = 0,5977$). Die Ulzerationen dauerten durchschnittlich $3,6 \pm 0,8$ Tage (schraffierter Bereich) an.

4.2.4 Sonstige Effekte der Einzeitbestrahlung

Eine grafische Darstellung des Gewichtsverlaufs der Tiere nach Einzeitbestrahlung zeigt Abb. 14. Die Tiere der mit Dosen von 8, 11, 15 und 18 Gy bestrahlten Gruppen zeigten eine maximale Gewichtsabnahme zwischen 5,2 % und 7,9 % an den Tagen 13 und 15. Die Gewichtsabnahme der mit 13 Gy bestrahlten Tiere war weniger stark ausgeprägt mit einem Maximum von 3,0 % an Tag 15. Es zeigte sich keine Störung des Allgemeinzustandes oder des Verhaltens der Tiere in Folge der Bestrahlung.

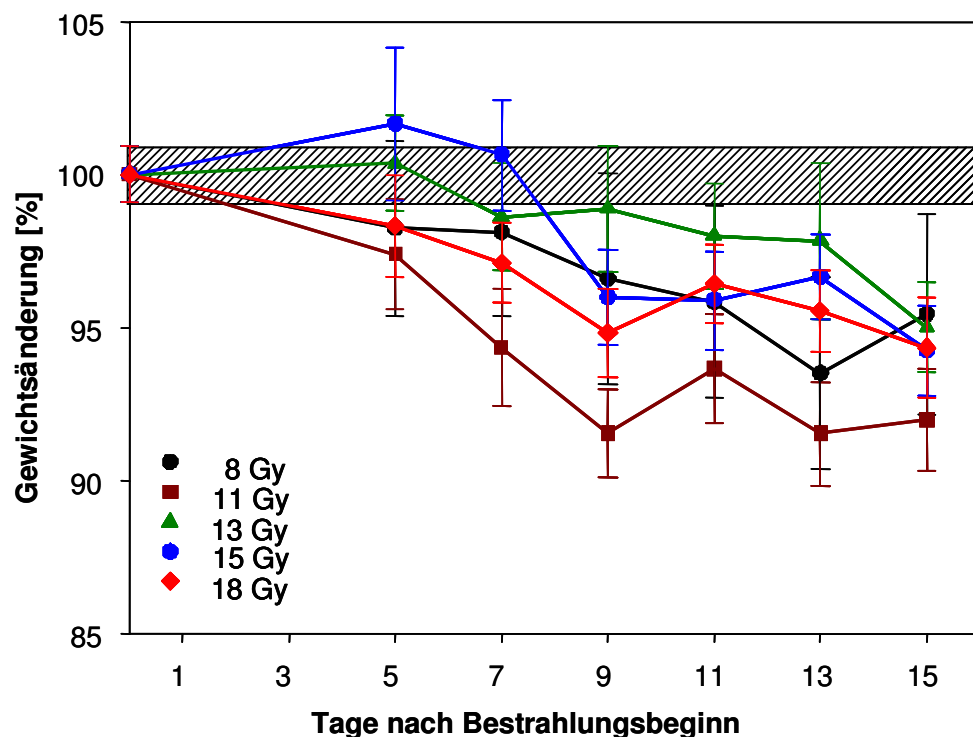


Abb. 14: Gewichtsverlauf der Mäuse nach Einzeitbestrahlung (Versuch M1/0)

Dargestellt ist die relative Gewichtsänderung der Tiere im zeitlichen Verlauf der einzelnen Strahlendosisgruppen ($MW \pm SEM$, $n = 10$), bezogen auf das Ausgangsgewicht zum Zeitpunkt der Einzeitbestrahlung (100 %).

4.3 Einfluss von Glutathion auf die Strahlenreaktion des Zungenepithels nach Einzeitbestrahlung (Versuche M1/1, M1/2)

In den Versuchen M1/1 und M1/2 sollte der Einfluss der Glutathionapplikation auf die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut nach Einzeitbestrahlung untersucht werden. Die Applikation erfolgte in zwei Zeiträumen: von Tag -3 bis zur Ulkusdiagnose oder bis zur vollständigen Heilung aller Ulzerationen. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tab. 17 zusammengefasst. Die Dosis-Effekt-Kurven sind in Abb. 15 dargestellt.

Tab. 17: Ergebnisse der Einzeitbestrahlung

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse der Einzeitbestrahlung mit Glutathionapplikation (M1/1, M1/2) im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung (M1/0). Glutathion wurde von Tag -3 bis zur Erstdiagnose (-3/D) bzw. der vollständigen Heilung der ulzerativen Läsionen (-3/H) appliziert. Im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung wurde kein Effekt der Behandlung mit Glutathion festgestellt.

Versuch	Glutathion Beginn Ende (Tag)	ED ₅₀ ± σ ¹ [Gy]	p _{Dosis} ²	p _{vs.Kontrolle} ³	Mittlere Latenzzeit ⁴ ± SD[d]	Mittlere Ulkusdauer ± SD[d]
M1/0	-	13,0 ± 0,7	0,0034	-	12,5 ± 0,9	3,6 ± 0,9
M1/1	-3/ D	12,8 ± 0,7	0,0030	0,6907	11,6 ± 1,2	3,7 ± 1,1
M1/2	-3/ H	12,3 ± 0,6	0,0028	0,2830	11,6 ± 1,2	4,0 ± 0,8

¹ Standardabweichung σ der ED₅₀

² p-Wert für die Dosisabhängigkeit der Reaktion

³ p-Wert für den Unterschied zum Kontrollversuch

⁴ bezogen auf den Tag der Testbestrahlung

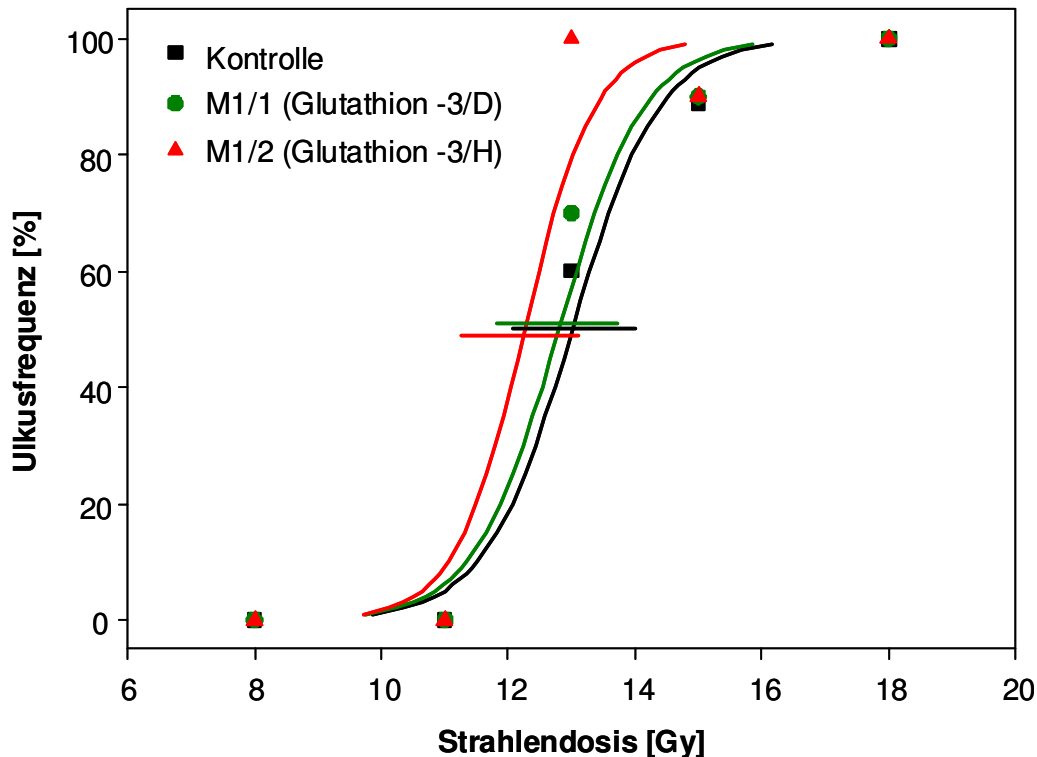


Abb. 15: Dosis-Effekt-Kurven nach lokaler Einzeitbestrahlung und Glutathion-Applikation (-3/D bzw. -3/H) im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung (Kontrolle)

Die Berechnung der Dosis-Effekt-Kurven erfolgte mittels Probit-Analyse. Die ED_{50} dieser Versuche sind mit den jeweils dazugehörigen 95 % Vertrauensintervallen als Fehlerbalken dargestellt. Die Glutathiongabe hat in Verbindung mit Einzeitbestrahlungen keinen signifikanten oder systematischen Einfluss auf die Strahlentoleranz.

Die Dosis-Effekt-Kurven für die Einzeitbestrahlung waren steil und gut definiert. Die Applikation von Glutathion führte zu keiner signifikanten oder systematischen Veränderung der Strahlentoleranz bei Einzeitbestrahlung. Es wurden ED_{50} -Werte zwischen 12,3 Gy und 13,0 Gy gemessen. Die Dosisabhängigkeit der Ulkusfrequenzen war in allen Versuchen signifikant ($p < 0,05$, Tab. 17).

Die Latenzzeit bis zum Eintritt der Ulzerationen bei den mit Glutathion behandelten Tieren war mit durchschnittlich 11,6 Tagen gegenüber der Kontrolle (12,6 Tage) etwas verkürzt. Die Dauer der ulzerativen Läsion bei Glutathionapplikation betrug zwischen 3,7 und 4,0 Tage, vergleichbar mit denjenigen der Kontrollgruppe (3,6 Tage). Beide Parameter waren dosisunabhängig.

4.4 Konventionell fraktionierte Bestrahlung

4.4.1 Alleinige Bestrahlung (Versuche M2/0, M3/0)

In den Versuchen M2/0 und M3/0 erfolgte eine externe (perkutane) Bestrahlung über eine Woche (5 x 3 Gy, Tag 0 - 4), bzw. 2 Wochen (10 x 3 Gy, Tag 0 - 4, 7 - 11). Die fraktionierte Bestrahlung wurde mit einer lokalen Testbestrahlung an Tag 7 (M2/0) bzw. Tag 14 (M3/0) abgeschlossen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 18 zusammengefasst.

Tab. 18: Ergebnisse der alleinigen fraktionierten Bestrahlung (M2/0, M3/0)

Versuch	Fraktionierung	Testdosis-ED ₅₀ ± σ [Gy]	p _{Dosis} ¹	Mittlere Latenzzeit ² ± SD[d]	Mittlere Ulkusdauer ± SD[d]
M2/0	5 x 3 Gy	11,1 ± 0,1	< 0,0001	7,6 ± 1,0	3,7 ± 0,7
M3/0	10 x 3 Gy	12,1 ± 0,1	< 0,0001	8,2 ± 0,4	3,2 ± 0,6

¹ bezogen auf den Tag der Testbestrahlung

² p-Wert für die Abhängigkeit der Ulkusinzidenz von der Testdosis, berechnet nach der unter 3.5.1 beschriebenen Methode

4.4.1.1 Dosisabhängigkeit der Ulkusfrequenzen

Die ED_{50} -Werte für fraktionierte Bestrahlungen (M2/0, M3/0) und Einzeitbestrahlung (M1/0) sind in Abb. 16 gegenübergestellt. Die Dosisabhängigkeiten waren für jeden der Versuche signifikant. Die ED_{50} -Werte betrugen $11,1 \pm 0,1$ Gy (M2/0) und $12,1 \pm 0,1$ Gy (M3/0). Der niedrigere ED_{50} -Wert der Testbestrahlung nach der Fraktionierung mit 5×3 Gy gegenüber der Einzeitbestrahlung beruht auf der vorab applizierten fraktionierten Dosis, die bei der Berechnung nicht berücksichtigt wurden (siehe 5.2.3). In der zweiten Woche der fraktionierten Bestrahlung tritt keine weitere Reduktion der ED_{50} für die Testbestrahlung ein. Dies ist auf Repopulierungsvorgänge im Epithel (siehe 2.7.3 und 5.3.3) zurückzuführen.

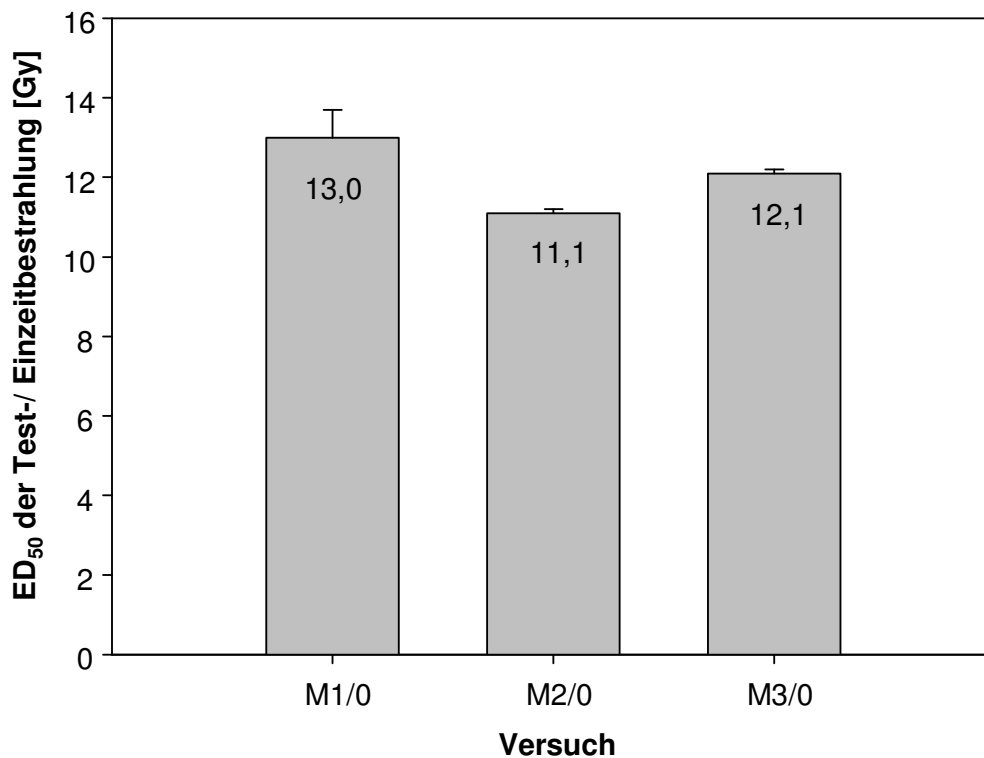


Abb. 16: Übersicht über die ED_{50} -Werte der Kontrollversuche M1/0, M2/0 und M3/0 nach Testbestrahlung

Die Abbildung zeigt die ED_{50} -Werte für die lokale Bestrahlung der Kontrollversuche nach Einzeitbestrahlung (M1/0), nach einwöchiger fraktionierter Bestrahlung (M2/0) und nach zweiwöchiger fraktionierter Bestrahlung (M3/0). Die Fehlerbalken geben die jeweilige Standardabweichung σ der ED_{50} an.

4.4.1.2 Zeitlicher Verlauf

Die Ulkusprävalenzen in den Kontrollversuchen mit fraktionierter Bestrahlung sind in Abb. 17 illustriert. Die ersten ulzerativen Läsionen wurden in Versuch M2/0 an Tag 6 festgestellt. Die höchste Prävalenz wurde an Tag 9 beobachtet. Nach maximal 12 Tagen waren alle aufgetretenen Ulzerationen reepithelialisiert. Die mittlere Latenz betrug $7,6 \pm 1,0$ Tage, bezogen auf den Tag der Testbestrahlung, die mittlere Ulkusdauer $3,7 \pm 0,7$ Tage. In Versuch M3/0 wurden die ersten Ulzerationen an Tag 8 beobachtet. Die mittlere Latenz nach der lokalen Testbestrahlung war $8,2 \pm 0,4$ Tage, die mittlere Ulkusdauer betrug $3,2 \pm 0,6$ Tage.

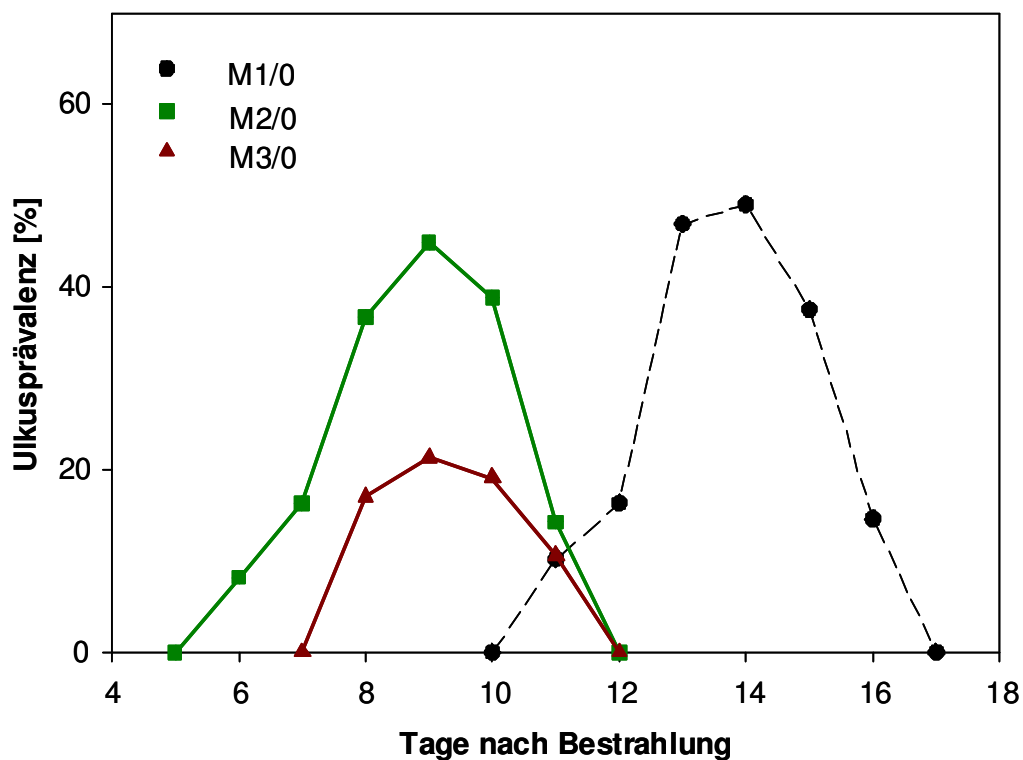


Abb. 17: Ulkusprävalenz in den Kontrollversuchen M2/0 und M3/0 im Vergleich zur Einzeitbestrahlung (Versuch M1/0)

Bei einwöchiger (M2/0) bzw. zweiwöchiger (M3/0) fraktionierter Bestrahlung traten die ersten Ulzerationen an Tag 6 bzw. Tag 8 nach der abschließenden Testbestrahlung auf. Die maximale Anzahl an Reagenten wurde in beiden Versuchen an Tag 9 beobachtet. Die Reepithelialisierung der Schleimhäute war an Tag 12 abgeschlossen.

4.4.2 Bestrahlung mit 5 x 3 Gy und Glutathionapplikation (Versuche M2/1 – M2/3)

In diesen Versuchen wurde die Wirkung unterschiedlicher Applikationszeiträume von Glutathion während der fraktionierten Bestrahlung über eine Woche (5 x 3 Gy) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 19 zusammengefasst.

Tab. 19: Ergebnisse der konventionell fraktionierten Bestrahlung über eine Woche (Versuche M2/x)

Versuch	Glutathion Beginn Ende (Tag)	Testdosis-ED ₅₀ ± σ [Gy]	p _{Dosis} ¹	p _{vs.Kontrolle}	Mittlere Latenzzeit ² ± SD[d]	Mittlere Ulkusdauer ± SD[d]
M2/0	---	11,1 ± 0,1	< 0,001 ³	---	7,6 ± 1,0	3,7 ± 0,7
M2/1	-3 7	12,0 ± 0,0	< 0,001 ³	0,634 ⁴	7,1 ± 1,3	4,3 ± 1,1
M2/2	-3 D	14,6 ± 1,8	0,0022	0,0058	7,9 ± 0,7	3,4 ± 1,0
M2/3	-3 H	13,1 ± 0,6	0,0031	0,0177	7,5 ± 1,1	4,6 ± 0,7

¹ p-Wert für die Abhängigkeit der Ulkusinzidenz von der Testdosis

² bezogen auf den Tag der Testbestrahlung

³ berechnet nach der unter 3.5.1 beschriebenen alternativen Methode

⁴ berechneter statistischer Vergleich der Dosis-Mittelwerte mit t-Test

Durch die Applikation von Glutathion von Tag -3 bis zur Diagnose der Ulzerationen bzw. bis zur Heilung (M2/1 und M2/2) wurde eine signifikante Zunahme der isoeffektiven Dosen festgestellt. Die Applikation von Glutathion von Tag -3 bis Tag 7 (M2/3) zeigte keinen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrolle (Versuch M2/0). Die Dosisabhängigkeit der Ulkusfrequenz (p_{Dosis}) war in allen Versuchen signifikant.

4.4.2.1 Dosisabhängigkeit der Ulkushäufigkeit

Alle Dosis-Effekt-Kurven waren steil und gut definiert. Die Dosisabhängigkeit der Ulkusfrequenzen war für jeden dieser Versuche signifikant (Tab. 19). Die ED₅₀-Werte der Versuche M2/0 - M2/3 sind in Abb. 18 dargestellt. Die isoeffektiven Dosen für die Behandlung mit Glutathion von Tag -3 bis zur Erstdiagnose (M2/2) bzw. bis zur Heilung (M2/3) waren im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Die Applikation von Glutathion von Tag -3 bis Tag 7 (M2/1) führte dagegen nicht zu einer signifikanten Änderung der isoeffektiven Dosen gegenüber der Kontrolle.

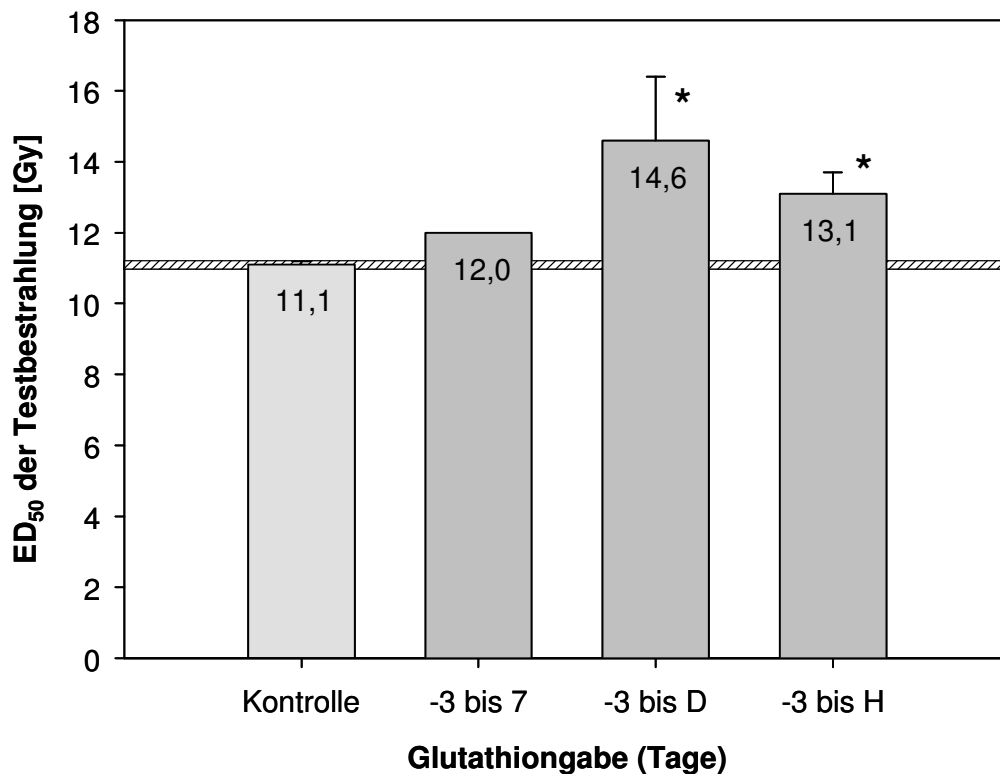


Abb. 18: ED₅₀-Werte nach konventionell fraktionierter Bestrahlung über eine Woche in Verbindung mit Glutathiongabe

Dargestellt sind die ED₅₀-Werte nach konventionell fraktionierter Bestrahlung über eine Woche in Verbindung mit Glutathiongabe (M2/1-M2/3) im Vergleich zur Kontrolle (M2/0). Der schraffierte Bereich zeigt die ED₅₀ ± σ für die Testbestrahlung der Kontrolle an. Der Fehlerbalken gibt die jeweilige Standardabweichung σ der ED₅₀ an. Die Glutathiongabe von Tag -3 bis zur Diagnose bzw. Heilung führte zu einer signifikanten Erhöhung der ED₅₀-Werte ($p = 0,0058$, $p = 0,0177$). * $p < 0,05$

4.4.2.2 Zeitlicher Verlauf

Der zeitliche Verlauf der Schleimhautreaktion in den Versuchen M2/0 - M2/3 ist in Abb. 19 dargestellt. Die ersten Ulzerationen traten an Tag 3 auf. Die maximale Ulkusprävalenz wurde an Tag 9 festgestellt. Die vollständige Reepithelialisierung war bis Tag 14 abgeschlossen. Latenzzeit und Ulkusdauer wurden durch die Applikation von Glutathion in den verschiedenen Zeiträumen nicht beeinflusst (Tab. 19). Die mittleren Latenzzeiten der mit Glutathion behandelten Gruppen variierten zwischen $7,1 \pm 1,3$ Tagen und $7,9 \pm 0,7$ Tagen nach der Testbestrahlung. Die Ulzerationen dauerten zwischen $3,4 \pm 1,0$ Tagen und $4,6 \pm 0,7$ Tagen an.

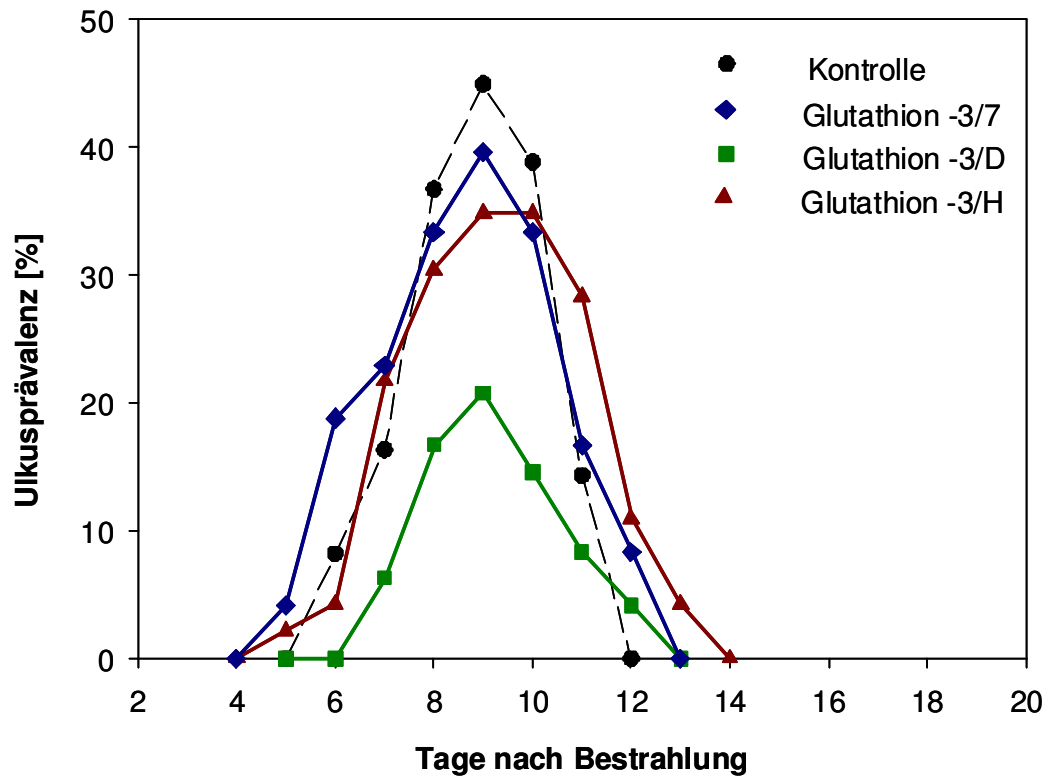


Abb. 19: Ulkusprävalenz nach einwöchiger fraktionierter Bestrahlung und Glutathionapplikation

Die Applikation von Glutathion an den Tagen -3/D (M2/2) führte auf Grund der insgesamt geringeren Anzahl an Tieren mit einer Ulzeration zu einer deutlich niedrigeren Ulkusprävalenz gegenüber der Kontrolle. Die maximale Ulkusprävalenz wurde in allen Versuchen (M2/0 - M2/3) an Tag 9 beobachtet. Die vollständige Reepithelialisierung erfolgte an Tag 12 (M2/0), Tag 13 (M2/1; M2/2) und Tag 14 (M2/2).

4.4.3 Bestrahlung mit 10 x 3 Gy und Glutathionapplikation (Versuche M3/1 - M3/5)

In den Versuchen M3/1 - M3/5 sollte der Einfluss einer Glutathionapplikation in verschiedenen Zeiträumen während einer zweiwöchigen fraktionierten Bestrahlung auf die Ausprägung einer radiogenen oralen Mukositis untersucht werden. Eine Übersicht über die Ergebnisse M3/1 - M3/5 im Vergleich zum zugehörigen Kontrollversuch M3/0 geben Tab. 20 und Abb. 20.

Tab. 20: Ergebnisse der fraktionierten Bestrahlung über zwei Wochen mit Glutathion in verschiedenen Applikationszeiträumen (M3/1 - M3/3) im Vergleich zum Kontrollversuch M3/0

Versuch	Glutathion Beginn Ende (Tag)	ED ₅₀ ± σ[Gy]	p _{Dosis} ¹	p _{vs.Kontrolle}	Mittlere Latenzzeit ² ± SD[d]	Mittlere Ulkusdauer ± SD[d]
M3/0	-	12,1 ± 0,1	< 0,001 ³	-	8,2 ± 0,4	3,2 ± 0,6
M3/1	-3 7	13,2 ± 1,0	0,0006	0,6285	7,5 ± 1,4	5,2 ± 0,9
M3/2	-3 14	12,4 ± 0,7	0,0024	0,5011	7,1 ± 1,5	5,1 ± 0,9
M3/3	-3 D	14,1 ± 0,7	0,0025	0,0724	7,7 ± 1,2	5,0 ± 0,9
M3/4	-3 H	13,5 ± 0,8	0,0012	0,2962	7,8 ± 1,1	5,5 ± 0,9
M3/5	7 14	13,7 ± 0,6	0,0030	0,1208	7,3 ± 1,0	5,2 ± 1,1

¹ p-Wert für die Abhängigkeit der Ulkusinzidenz von der Testdosis

² bezogen auf den Tag der Testbestrahlung

³ berechnet nach der unter 3.5.1 beschriebenen alternativen Methode

Die Tabelle fasst die Ergebnisse der Versuche M3/0 - M3/5 zusammen. Die Dosisabhängigkeit der Ulkusfrequenz (p_{Dosis}) war in allen Versuchen signifikant. Die Applikation von Glutathion führte zu keiner signifikanten Veränderung der Strahlentoleranz.

4.4.3.1 Dosisabhängigkeit der Ulkusfrequenz

Die Dosisabhängigkeiten der Ulkusfrequenzen waren in allen Versuchen M3/x signifikant (Tab. 20). Die Applikation von Glutathion während einer zweiwöchigen konventionellen fraktionierten Bestrahlung erhöhte die ED₅₀ auf 13,2 ± 1,0 Gy (M3/1), 12,4 ± 0,7 Gy (M3/2), 14,1 ± 0,7 Gy (M3/3), 13,5 ± 0,8 Gy (M3/4) und 13,7 ± 0,6 Gy (M3/5). Diese Werte waren von der Kontrolle statistisch nicht signifikant verschieden.

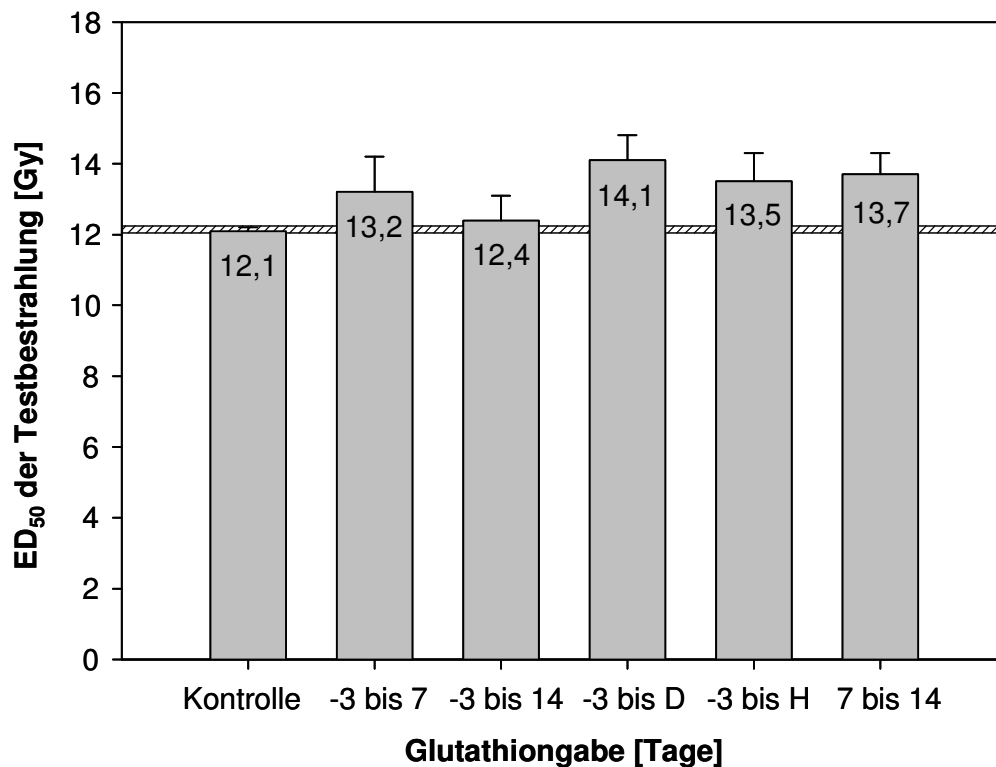


Abb. 20: Übersicht über die ED₅₀-Werte nach zweiwöchiger fraktionierter Bestrahlung mit Glutathionapplikation (M3/1 - M3/5) im Vergleich zum Kontrollversuch M3/0

Die Abbildung zeigt die ED₅₀-Werte in den Versuchen mit Glutathionbehandlung in verschiedenen Zeiträumen in Kombination mit fraktionierter Bestrahlung über 2 Wochen. Der schraffierte Bereich gibt die ED₅₀ ± σ für die Testbestrahlung der Kontrolle an. Die Fehlerbalken entsprechen der jeweiligen Standardabweichung σ der ED₅₀. Die ED₅₀-Werte für die Testbestrahlungen in den mit Glutathion behandelten Tieren unterscheiden sich nicht signifikant von derjenigen der Kontrolle.

4.4.3.2 Zeitlicher Verlauf

Eine graphische Darstellung der Ulkusprävalenzen der Versuche M3/0 - M3/5 zeigt Abb. 21. Erste Ulzerationen wurden ab Tag 4 beobachtet. Die maximale Ulkusprävalenz wurde an Tag 8 und Tag 9 festgestellt. Die vollständige Reepithelialisierung war bis Tag 15 abgeschlossen.

Die mittleren Latenzzeiten variierten zwischen $7,1 \pm 1,5$ Tagen und $8,2 \pm 0,4$ Tagen. Die Latenzzeiten für die Ulzerationen in den mit Glutathion behandelten Versuchen sind mit denjenigen der Kontrolle vergleichbar. Die mittlere Ulkusdauer betrug zwischen $3,2 \pm 0,6$ Tage und $5,5 \pm 0,9$ Tage. Die Ulkusdauer in den Versuchen mit Glutathionapplikation war signifikant länger als im Kontrollversuch ($p < 0,001$). Es konnte kein systematischer Einfluss der Strahlendosis auf die Ulkusdauer nachgewiesen werden. Latenzzeit und Ulkusdauer für die Versuche M3/0 - M3/5 sind in Tab. 20 zusammengefasst.

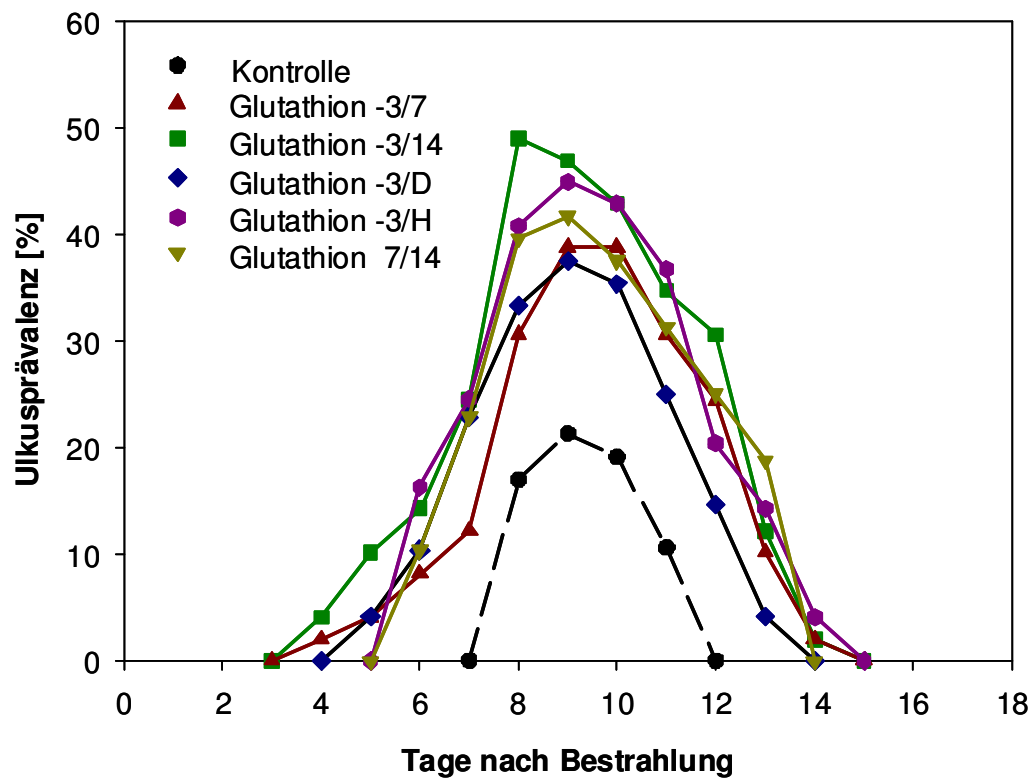


Abb. 21: Ulkusprävalenzen nach zweiwöchiger Bestrahlung und Glutathionapplikation

Die ersten Ulzerationen wurden an Tag 4 festgestellt. Die maximale Ulkusprävalenz wurde in allen Versuchen an den Tagen 8 und 9 beobachtet. Die vollständige Reepithelialisierung erfolgte an den Tagen 12 bis 15.

4.5 Histologische Untersuchungen

Für die histologischen Untersuchungen wurden bei fraktionierter Bestrahlung mit max. 10×3 Gy alle zwei Tage die Zungen von jeweils fünf Mäusen entnommen, in Formaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die $3 \mu\text{m}$ dicken Gewebeschnitte wurden mit Hämatoxilin/Eosin gefärbt, anschließend erfolgte eine mikroskopische Auswertung der Zellzahlen und Schichtdicken. Es wurde untersucht, inwiefern die Behandlung mit Glutathion, Fumonisin B1 oder Desipramin zu Veränderungen gegenüber dem unbehandelten Epithel führte. Dafür wurden die Präparate aus den Versuchen mit Fumonisin B1 und Desipramin von anderen Experimentatoren übernommen (siehe 3.4.1).

4.5.1 Histologie des unbehandelten Epithels

Ein histologisches Bild des Zungenepithels vor und nach fraktionierter Bestrahlung (10×3 Gy/2 Wochen) zeigt Abb. 22. Die durchschnittliche Gesamtzellzahl des unbehandelten Epithels der Zungenunterseite der Maus war 482 ± 10 Zellen/mm Epithellänge (MW \pm SEM). Etwa 70 % der kernhaltigen Zellen gehörten der Germinativschicht an (336 ± 8 Zellen/mm), die verbleibenden 30 % befanden sich in der funktionellen Schicht (146 ± 5 Zellen/mm). Die mittlere Epitheldicke war $77,5 \pm 2,2 \mu\text{m}$. Davon nahmen 22 % ($17,3 \pm 0,6 \mu\text{m}$) die Germinativschicht, 57 % ($43,7 \pm 2,0 \mu\text{m}$) die funktionelle Schicht und 21 % ($16,5 \pm 0,8 \mu\text{m}$) die Keratinschicht ein (Tab. 21).

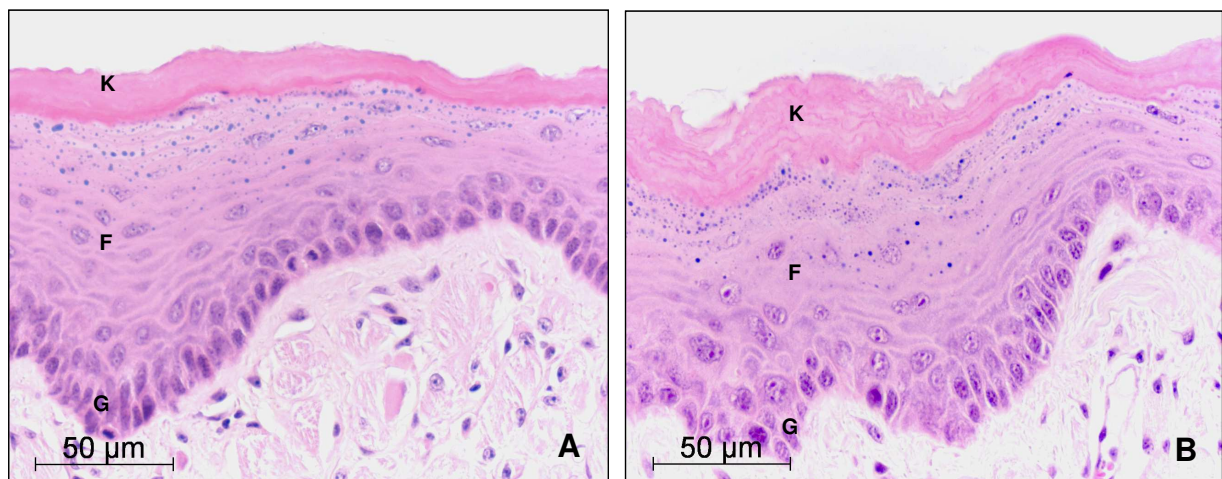


Abb. 22: Histologie des Epithels der Zungenunterseite vor (A) und nach (B) Bestrahlung mit 10×3 Gy über zwei Wochen (HE-Färbung)

Das histologische Bild des Epithels der Zungenunterseite zeigt folgende Schichten: Germinativschicht (G), funktionelle Schicht (F) und Keratinschicht (K). Im Vergleich zum unbehandelten Epithel (A) zeigt das behandelte Epithel an Tag 13 einer zweiwöchigen fraktionierten Bestrahlung eine Reduktion der Zelldichte der Germinativschicht. Die Zellgrenzen erscheinen „verwaschen“.

Tab. 21: Zelldichten und Schichtdicken des unbehandelten Epithels der Zungenunterseite (n = 20)

	Zellzahlen/ mm ± SEM		Schichtdicke [µm] ± SEM	
	absolut	relativ [%]	absolut	relativ [%]
Germinativschicht	336 ± 8	70	17,3 ± 0,6	22
funktionelle Schicht	146 ± 5	30	43,7 ± 2,0	57
Keratinschicht	-	-	16,5 ± 0,8	21
Gesamtepithel	482 ± 10	100	77,5 ± 2,2	100

4.5.2 Bestrahlung und Behandlung mit Inhibitoren der Sphingomyelinsynthese

4.5.2.1 Zelldichte

Die Ergebnisse der quantitativen histologischen Auswertung der Kontrolle und der mit Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin behandelten Proben sind in Abb. 23 grafisch dargestellt. Die Einzelwerte und ihre statistischen Fehler finden sich im Anhang (10.3.1).

Im Vergleich zum unbestrahlten Epithel nahm die Gesamtzellzahl im Kontrollversuch bis zum Ende der ersten Bestrahlungswoche auf 68,4 % des Ausgangswerts ab. Während des bestrahlungsfreien Wochenendes erholten sich die Zellzahlen auf durchschnittlich 90,9 %, um in der zweiten Bestrahlungswoche erneut auf ein Minimum von 69,6 % zu sinken. Nach Beenden der fraktionierten Bestrahlung stiegen die Zellzahlen auf maximal 116,4 % (Tag 25) an. Der beschriebene Verlauf der Gesamtzellzahlen spiegelte sich qualitativ sowohl in der Germinativschicht als auch funktionellen Schicht wider. Nach dem bestrahlungsfreien Wochenende erreichten die Zellzahlen der Germinativschicht sogar das Niveau der Ausgangswerte vor Bestrahlung. Am Ende des Beobachtungszeitraumes (Tag 25) waren die relativen Zellzahlen der Germinativschicht (125,4 %) deutlich höher als in der funktionellen Schicht (95,7 %).

Bei Behandlung mit Glutathion (Versuch H1) führte die Bestrahlung ab Tag 1 im gleichen Umfang wie bei der Kontrolle (Versuch H0) zu einer Reduktion der Gesamtzellzahl. Das Minimum wurde dabei an Tag 5 mit 68,6 % erreicht. Während der zweitägigen Bestrahlungspause am Wochenende erholten sich die Werte für die Zellzahlen auf 80,6 % des Ausgangswertes (Tag 7). Das Maximum der Gesamtzellzahl wurde an Tag 17 mit 132,4 % erreicht. Dieser Wert war gegenüber dem Maximum des Kontrollversuchs an Tag 25 mit 116,4 % höher. Nach Abschluss der fraktionierten Bestrahlung lag die Zelldichte deutlich oberhalb der Werte des Kontrollversuchs. Der Verlauf der Gesamtzellzahl fand sich auch in der Germinativ- und der funktionellen Schicht wieder.

Der Verlauf der Zellzahlen bei fraktionierter Bestrahlung und Fumonisin B1–Behandlung war vergleichbar mit demjenigen der nur bestrahlten Kontrollgruppe. Während der ersten Bestrahlungswoche sanken die Zellzahlen auf 57,6 % (Tag 5). Das bestrahlungsfreie Wochenende führte zu einer Erholung der Zellzahlen auf 86,2 % des Ausgangswertes (Tag 7). Das Maximum mit 118,3 % wurde an Tag 19 erreicht. Gegenüber der Kontrolle war der Verlust von Zellen in der ersten Bestrahlungswoche höher. Von diesem Zellverlust waren hauptsächlich Zellen der Germinativschicht betroffen. Am Ende des Beobachtungszeitraumes (Tag 25) war das Epithel vollständig regeneriert.

Die Applikation von Desipramin während und nach der der zweiwöchigen fraktionierten Bestrahlung führte zu einem ähnlichen Verlauf der epithelialen Zellzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die minimale Gesamtzellzahl in der ersten Bestrahlungswoche (Tag 3) war vergleichbar dem Minimum in der zweiten Woche (Tag 11). Die Minima der Germinativschicht (Tag 11) und der funktionellen Schicht (Tag 5) spiegeln diese Tendenz ebenfalls wider. In der Erholungsphase nach Ende der Bestrahlungen (Tag 17 bis Tag 21) entsprachen die Zellzahlen in allen Schichten wieder den Werten in der unbestrahlten Schleimhaut.

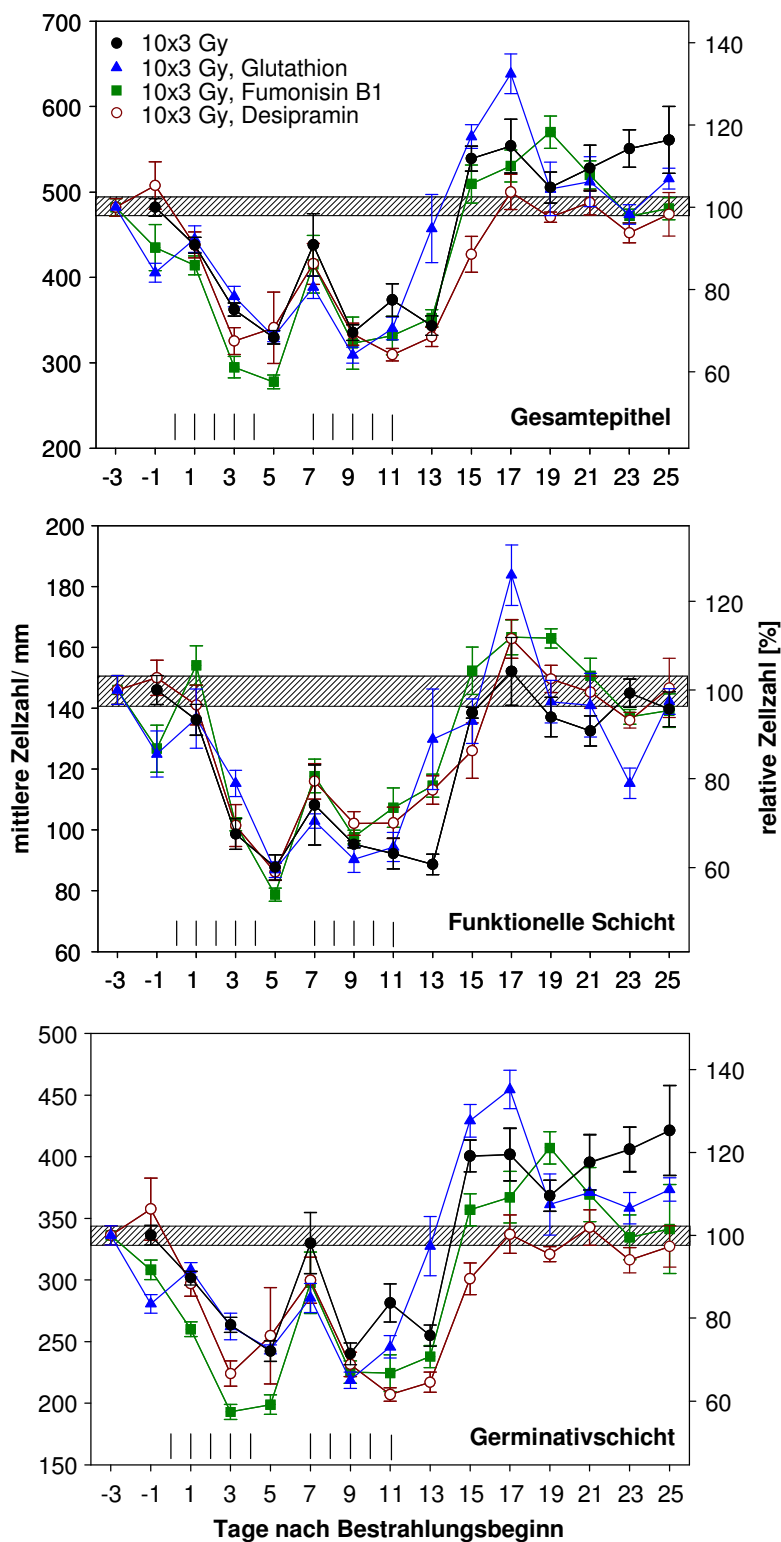


Abb. 23: Zellzahlen während und nach der Bestrahlung mit 5 x 3 Gy/Woche

Die Abbildung zeigt die Veränderung der Zellzahl während und nach der Bestrahlung mit 5 x 3 Gy/Woche allein (●) oder in Verbindung mit einer Behandlung mit Fumonisin (■), Desipramin (○) oder Glutathion (▲). Dargestellt ist der Verlauf der Zellzahl im Gesamtepithel (obere Abb.), in der Germinativschicht (mittlere Abb.) und in der Funktionsschicht (untere Abb.). Es sind jeweils die Mittelwerte von 5 Tieren/Tag gezeigt. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler der Mittelwerte (SEM). Der schraffierte Bereich zeigt den Mittelwert der Kontrolle mit Standardfehler (n = 20). Das Bestrahlungsprotokoll (I = 3 Gy) ist oberhalb der Abszissen dargestellt.

4.5.2.2 Schichtdicken

Die Veränderungen der Dicken von Gesamtepithel, Germinativschicht, funktioneller Schicht und Keratinschicht sind in Abb. 24 grafisch dargestellt. Die einzelnen Werte sind im Anhang unter 10.3.2 zusammengefasst.

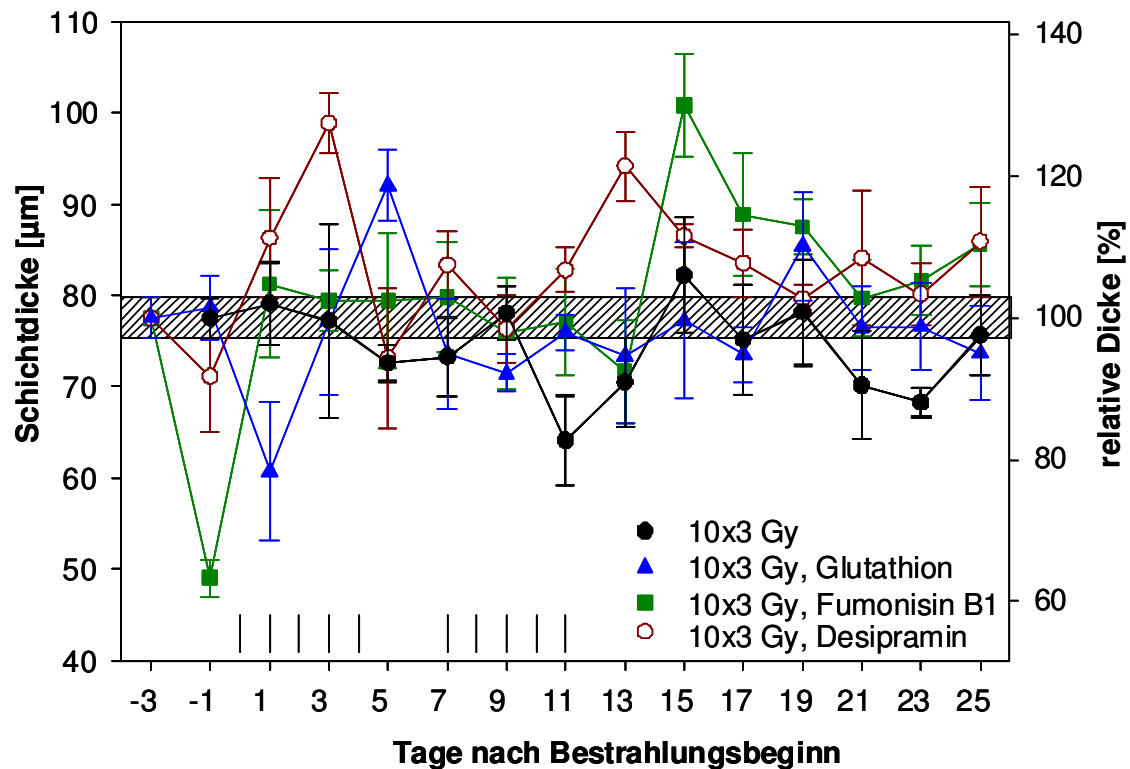


Abb. 24: Gesamtepitheldicke während und nach der Bestrahlung mit 10 x 3 Gy

Dargestellt ist der Verlauf der Epitheldicke während fraktionierter Bestrahlung. Gezeigt werden die Mittelwerte \pm SEM ($n = 5$). Untersucht wurde der Einfluss einer Behandlung mit Glutathion (\blacktriangle), Fumonisin B1 (\blacksquare) und Desipramin (\circ) im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung (\bullet). Die Werte der nur bestrahlten Kontrollgruppe unterliegen weniger großen Schwankungen als die der behandelten Tiere. Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Werte der unbestrahlten Kontrolle mit Standardfehler ($n = 20$). Das Bestrahlungsprotokoll (1 = 3 Gy) ist oberhalb der Abszisse angegeben.

Die durchschnittliche Dicke des gesamten Epithels vor Bestrahlung betrug $77,5 \mu\text{m} \pm 2,2 \mu\text{m}$ (100 %). Bei alleiniger Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen blieb die Dicke des Gesamtepithels während des gesamten Beobachtungszeitraumes nahezu konstant zwischen 82,7 % (Tag 11) und 106,0 % (Tag 15).

Sowohl die Bestrahlung in Kombination mit einer Behandlung mit Glutathion als auch mit Desipramin führten zu einer Zunahme der Dicke des Gesamtepithels in der ersten Bestrahlungswoche (Tag 5 bzw. Tag 3) um bis zu 20 %. Die Bestrahlung in Verbindung mit der Applikation von Fumonisin B1 führte dagegen erst in der zweiten Bestrahlungswoche zu einer maximalen Zunahme um ein Drittel (Tag 15). An der Dickenzunahme waren alle

epithelialen Schichten, insbesondere die Keratinschicht, beteiligt. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (Tag 25) wurden die Ausgangswerte wieder erreicht.

In Abb. 25 sind die jeweiligen Dicken der einzelnen Epithelschichten während alleiniger Bestrahlung mit 3 Gy/Fraktion und der Behandlung mit Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin illustriert. Die Einzelwerte finden sich in 10.3.2 im Anhang.

Die Dicke der Germinativschicht nahm während der ersten Bestrahlungswoche in allen Versuchen geringfügig ab. Ab Tag 13 nahm die Dicke der Germinativschicht für alle Versuche wieder zu, in Verbindung mit einer Behandlung mit Fumonisin B1 wurde die Zunahme im Vergleich zur Kontrolle um die Hälfte gesteigert (Tag 15). Zum Ende des Beobachtungszeitraumes wurden in allen Behandlungsprotokollen die Ausgangswerte erreicht.

Die funktionelle Schicht wies - in Abhängigkeit von der jeweiligen Behandlung - stärkere Unterschiede der Schichtdicken auf. Die Desipramin-behandelten Proben zeigten eine Zunahme um ein Drittel (Tag 3 und Tag 13). Die Kontrolle sowie die mit Fumonisin B1 und Glutathion behandelten Zungen zeigten eine geringfügige Abnahme der Breite der funktionellen Schicht während der zweiten Bestrahlungswoche. Zum Ende des Beobachtungszeitraumes hin näherten sich die Kurven aller Versuche an das Niveau der Ausgangswerte an.

Die Bestrahlung in Verbindung mit einer Behandlung mit Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin führte zu einer maximalen Dickenzunahme der Keratinschicht um rund die Hälfte im Vergleich zur Kontrolle (Tag 3 bis Tag 7), wobei die behandelten Präparate gegenüber der Kontrolle eine stärkere Zunahme aufwiesen. Nach Abschluss der fraktionierten Bestrahlung erreichte die Dicke der Keratinschicht innerhalb kurzer Zeit wieder die Ausgangswerte.

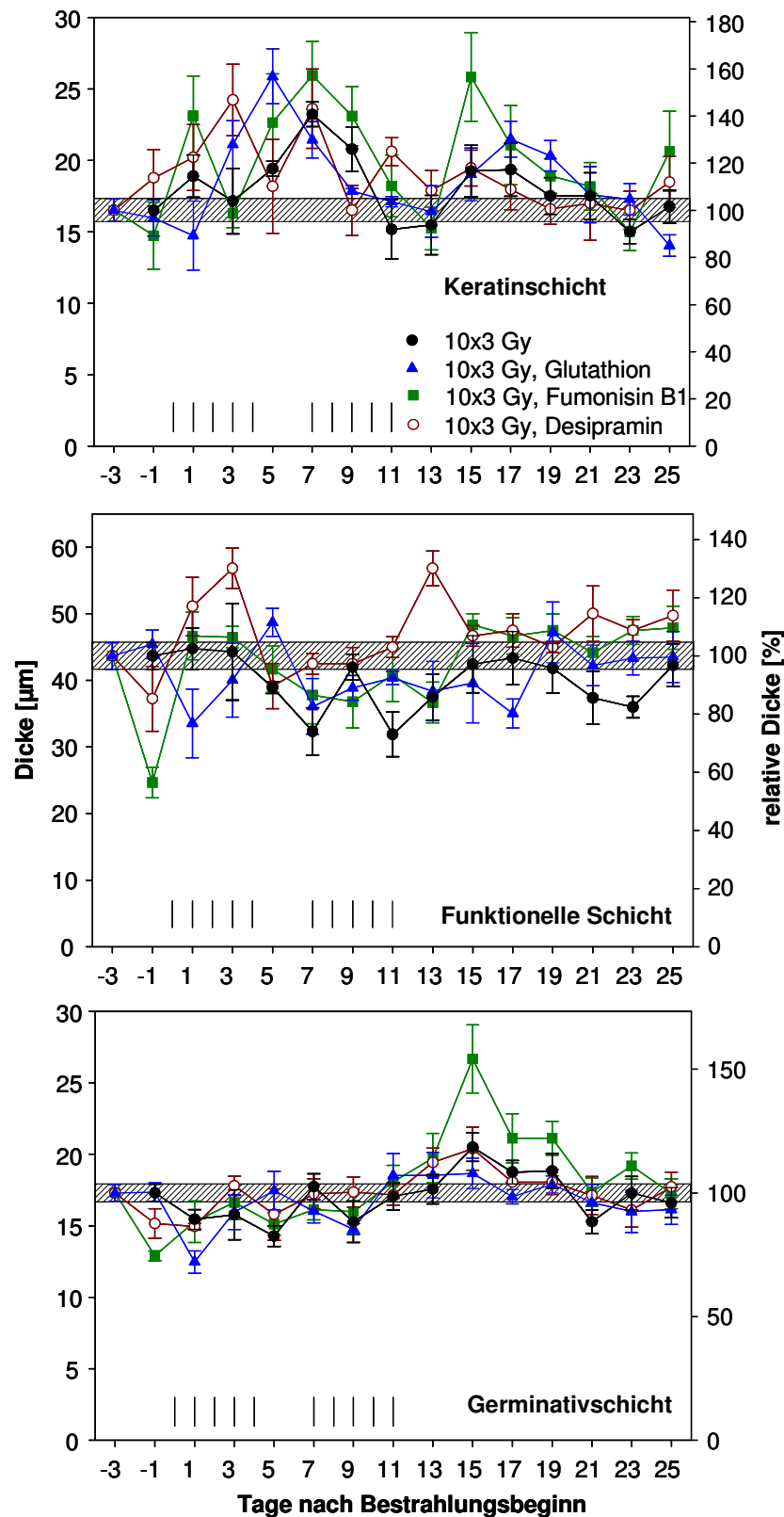


Abb. 25: Dicken der einzelnen Epithelschichten während und nach fraktionierter Bestrahlung mit 10 x 3 Gy

Dargestellt sind die Mittelwerte von je fünf Tieren pro Entnahmetag während der Behandlung mit Glutathion (▲), Fumonisin B1 (■) oder Desipramin (○) gegenüber alleiniger Bestrahlung (●). Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler (SEM). Der schraffierte Bereich kennzeichnet die Werte der unbestrahlten Kontrolle mit Standardfehler (n = 20). Das Bestrahlungsprotokoll (I = 3 Gy) ist oberhalb der Abszisse angegeben. Die Bestrahlung führte zu einer deutlichen Zunahme der Keratinschicht in der ersten Woche.

4.6 Immunhistochemische Untersuchungen

4.6.1 Proliferationsmarker Ki-67

Zur Untersuchung der Wirkung von Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin auf die Proliferation der Mundschleimhaut wurde die Anzahl der Ki-67-markierten Zellen pro Längeneinheit Epithel bestimmt und zusätzlich in das Verhältnis zur Gesamtzellzahl zum jeweiligen Zeitpunkt gesetzt (Markierungsindex). Eine repräsentative Färbung des Antikörpers Ki-67 (TEC-3) zeigt Abb. 26.

Ki-67 wurde ausschließlich von den Zellen der basalen und suprabasalen Epithelschichten exprimiert. Die nukleäre Färbung war von einer moderaten Intensität. Eine parallel durchgeführte Isotyp-Kontrolle mit Ratten-IgG zum Nachweis der Spezifität der Ki-67-Färbung war negativ (Daten nicht gezeigt).

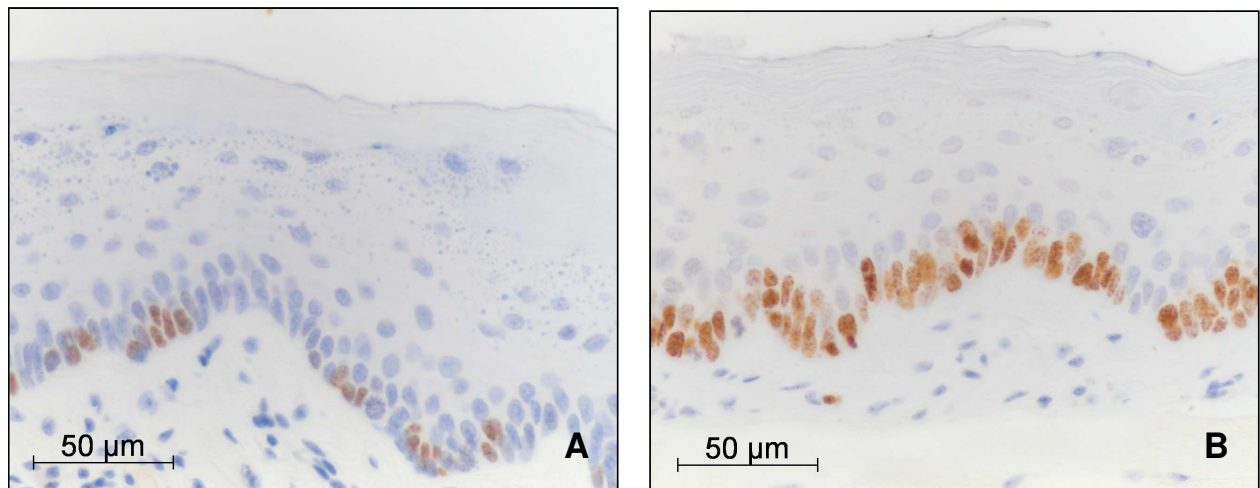


Abb. 26: Immunhistochemischer Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67

Abbildung A zeigt Ki-67 positive Zellen (braun) im Epithel der Zungenunterseite der Maus vor Bestrahlung. Das Expressionsmuster von Ki-67 an Tag 15 nach einer fraktionierten Bestrahlung (10 x 3 Gy, Tag 0-4, 7-11) zeigt Abbildung B.

Die absoluten und relativen Zahlen Ki-67 – positiver Zellen der Schleimhaut der ausschließlich bestrahlten Kontrolle der behandelten Tiere zeigt Abb. 27. Pro Millimeter Zungenepithel aus der Kontrollgruppe wurden 153 ± 8 (MW \pm SEM) Ki-67 positive Zellen gezählt. Dies entspricht einem Markierungsindex von $32,1 \pm 1,6$ % Zellen. Nach dem ersten Bestrahlungstag (Tag 1) sank die Zahl Ki-67 positiver Zellen der Kontrolle auf 24 ± 13 Zellen/mm Epithellänge; entsprechend einem relativen Wert von $5,6 \pm 0,8$ %. Bis zum Anfang der zweiten Bestrahlungswoche (Tag 7) nahm die Zahl Ki-67 positiver Zellen stetig zu und erreichte Maximalwerte bis zu 179 ± 25 Zellen/mm Epithellänge ($43,1 \pm 6,6$ %). Im weiteren Verlauf stieg der Ki-67 -Markierungsindex der unbehandelten Proben erneut bis Tag 15 an. Zum Ende des Beobachtungszeitraumes lagen die Anzahl und der

Markierungsindex der Ki-67 positiven Zellen in der Kontrollgruppe unter denen der Ausgangswerte.

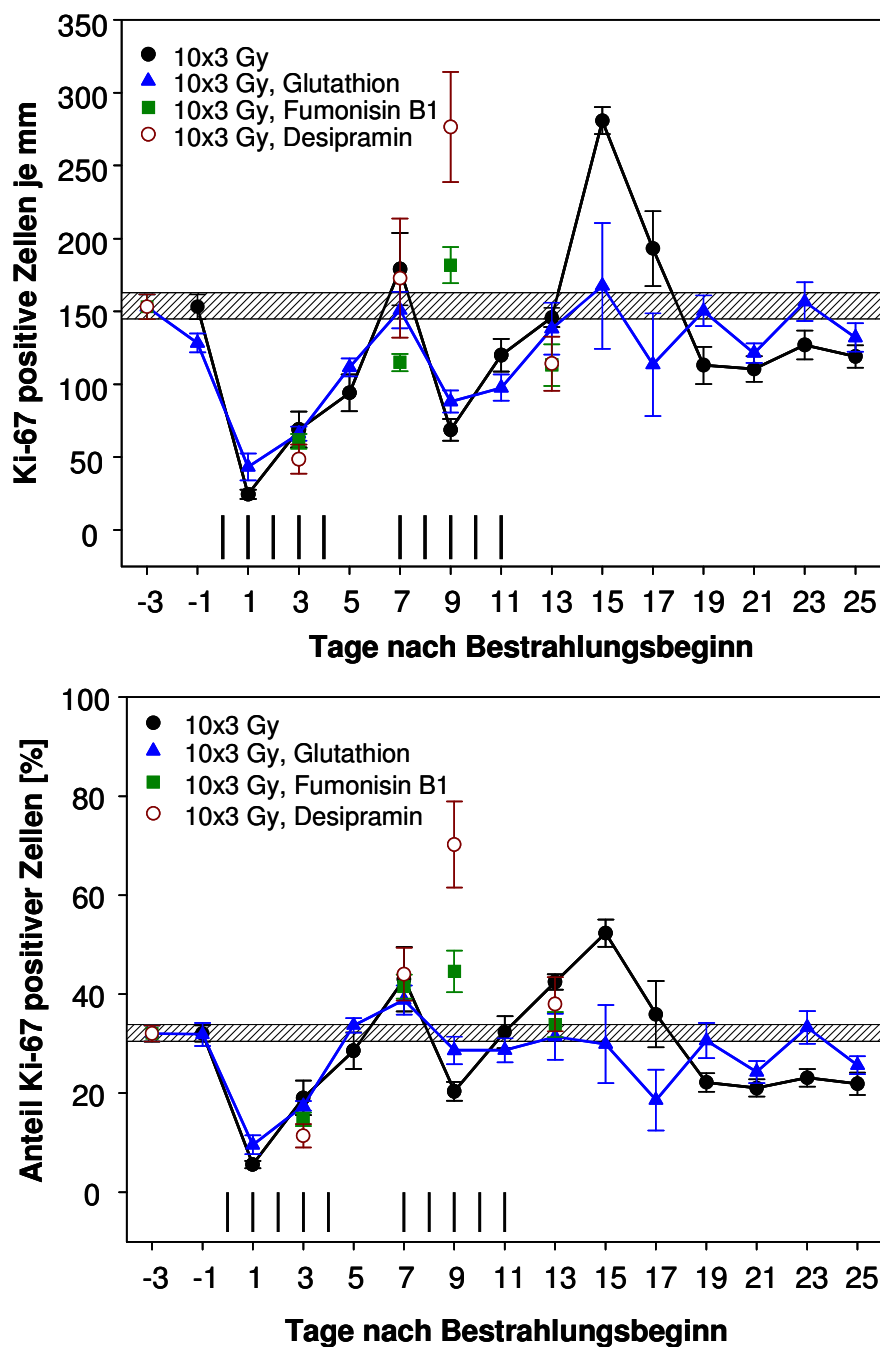


Abb. 27: Zeitlicher Verlauf der Anzahl Ki-67 positiver Zellen je mm Zungenepithel (obere Abbildung) und prozentualer Anteil Ki-67 positiver Zellen (untere Abbildung) während einer fraktionierten Bestrahlung (10 x 3 Gy)

Dargestellt ist der Verlauf der Anzahl Ki-67 positiver Zellen (ob. Abb.) sowie der Markierungsindex (unt. Abb.) im Epithel der Zungenunterseite während alleiniger Bestrahlung (●) und in Kombination einer Behandlung mit Glutathion (▲), Fumonisin B1 (■) oder Desipramin (○). Für die Behandlung mit Fumonisin B1 und Desipramin wurden exemplarisch die Tage -3, 3, 7, 9 und 13 ausgewertet. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM) der Mittelwerte (n = 5). Der schraffierte Bereich zeigt die Kontrolle (n = 10) mit Standardfehler. Das Bestrahlungsprotokoll ist oberhalb der Abszisse angegeben.

Die Behandlung mit Glutathion führte zu einem ähnlichen Verlauf der Ki-67 markierten Zellen. Die Reduktion auf 43 ± 9 Ki-67 positive Zellen je Millimeter Epithellänge (entsprechend einem Markierungsindex von $9,6 \pm 1,9 \%$) an Tag 1 ist vergleichbar den Veränderungen der Kontrollgruppe während der ersten Bestrahlungswoche. Nach dem Maximum an Tag 7 blieb die Anzahl Ki-67 positiver Zellen ebenso konstant im Bereich der Ausgangswerte wie der Markierungsindex. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte keine Zunahme der Proliferation der Mundschleimhaut der mit Glutathion behandelten Tiere festgestellt werden.

Der immunhistochemische Nachweis von Ki-67 für die Versuche H2 (Fumonisin B1) und H3 (Desipramin) wurde exemplarisch für die Tage -3, 3, 7, 9 und 13 durchgeführt. Die Behandlung mit Fumonisin B1 und Desipramin zeigte in der ersten Bestrahlungswoche einen mit der Kontrolle vergleichbaren Rückgang des Anteils Ki-67 positiver Zellen. Die maximale Anzahl Ki-67 positiver Zellen während der Behandlung mit Desipramin wurde an Tag 9 mit 277 ± 38 Zellen/mm Epithellänge bzw. einem Markierungsindex von $70,3 \pm 8,7 \%$ erreicht. Das Maximum der Desipramin-behandelten Proben an Tag 9 erreichte damit das Doppelte des Ausgangswertes und zeigte im Vergleich zu den anderen Behandlungen und der Kontrolle die größte Zunahme Ki-67 positiver Zellen. Der Ki-67 Markierungsindex der Fumonisin B1- und Desipramin-behandelten Gruppen näherte sich an Tag 13 wieder an das Niveau vor Bestrahlung an. Eine detaillierte Zusammenfassung der einzelnen Werte befindet sich im Anhang (10.3.3).

4.6.2 Aktivierte Caspase-3

4.6.2.1 Zungenepithel

Abb. 28 zeigt exemplarisch Färbeergebnisse für aktivierte Caspase-3. Gefärbte Zellen waren vorrangig in der Germinativschicht, sehr selten in der funktionellen Schicht zu finden. Für die Bestimmung des Markierungsindex wurde wiederum die absolute Anzahl gefärbter Zellen pro Längeneinheit Epithel ermittelt und in das Verhältnis zur Gesamtzellzahl gesetzt. Eine Illustration der absoluten Anzahl positiver Zellen/mm Epithellänge bzw. des prozentualen Anteils positiver Zellen gibt Abb. 29.

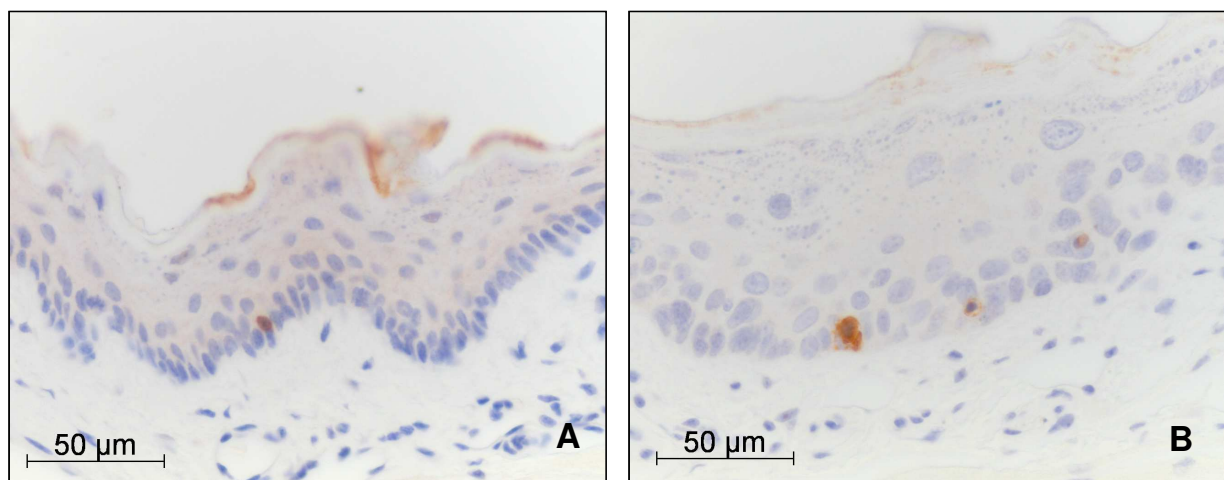


Abb. 28: Immunhistochemischer Nachweis aktivierter Caspase-3 positiver Zellen im Zungenepithel an Tag 0 (A) und an Tag 11 (B)

Dargestellt sind die Färbeergebnisse von unbehandelten Präparaten für aktivierte Caspase-3 vor Bestrahlung (A) und exemplarisch an Tag 11 nach Bestrahlung mit 5 x 3 Gy/Woche (B).

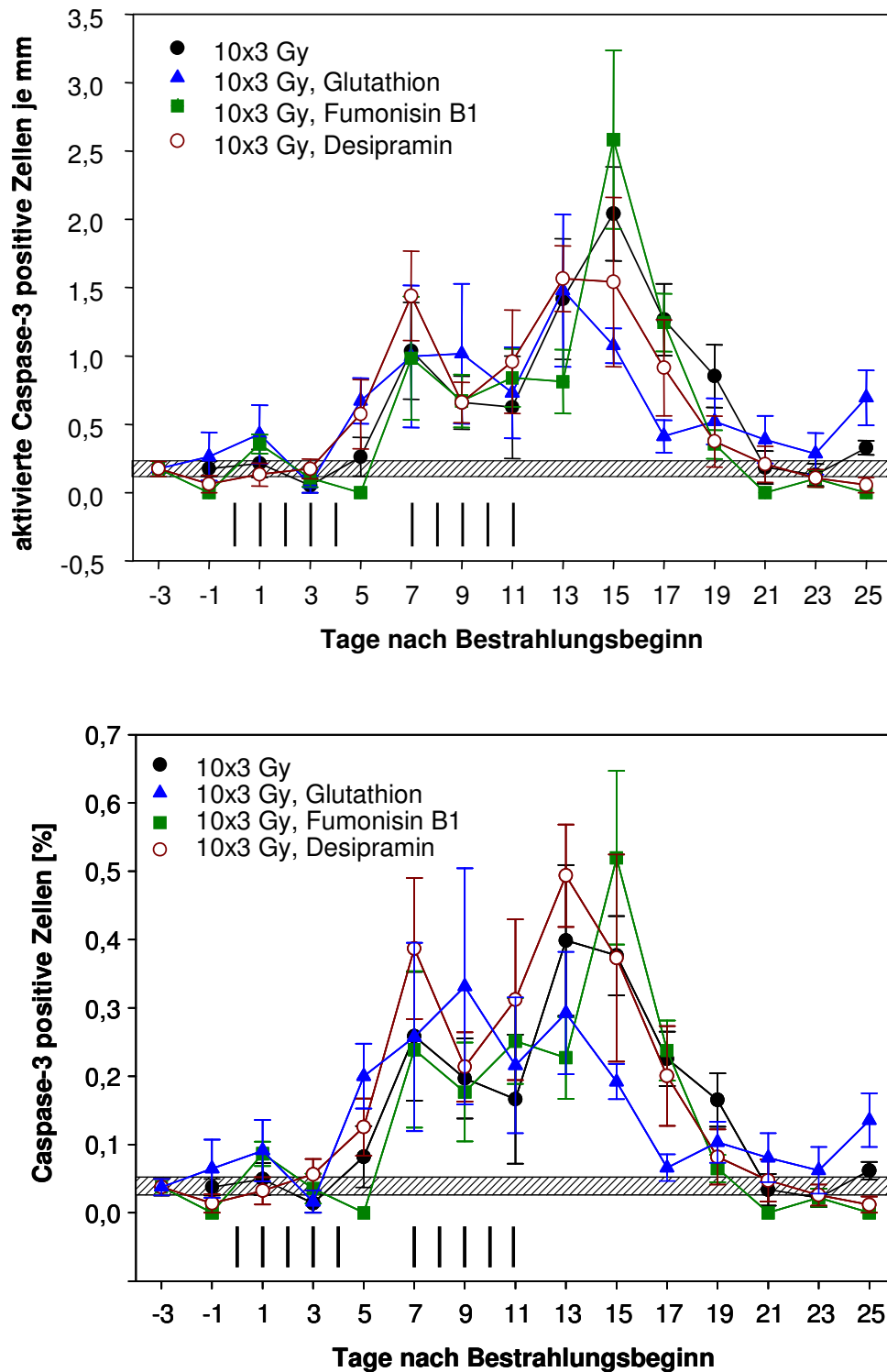


Abb. 29: Anzahl aktivierter Caspase-3 positiver Zellen je mm Zungenepithel (ob. Abb.) und prozentualer Anteil aktivierter Caspase-3 positiver Zellen an der Gesamtzellzahl (unt. Abb.)

Dargestellt ist der Verlauf der Anzahl aktivierter Caspase-3 positiver Zellen während der fraktionierten Bestrahlung. Es wurde jeweils mit den Inhibitoren Glutathion (▲), Fumonisin B1 (■) oder Desipramin (○) behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von 5 Tieren/Tag. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM). Der schraffierte Bereich zeigt die Kontrolle (n = 20) mit Standardfehler. Das Bestrahlungsprotokoll (I=3 Gy) ist oberhalb der Abszisse aufgetragen.

Die absolute Zahl Caspase-3 positiver Zellen betrug in der Kontrollgruppe vor Bestrahlung $0,17 \pm 0,06$ Zellen/mm, entsprechend einem Markierungsindex von $0,04 \pm 0,01$ %. Während der ersten Bestrahlungswoche blieb der Anteil Caspase-3 positiver Zellen in der unbehandelten Kontrollgruppe konstant. Ab Anfang der zweiten Bestrahlungswoche (Tag 7) kam es zu einer deutlichen Zunahme des Caspase-3 Markierungsindex der Kontrollgruppe mit einem Maximum von $1,04 \pm 0,35$ Zellen/mm ($0,26 \pm 0,09$ %). An Tag 13 wurde der maximale Markierungsindex erreicht, welcher dem 10fachen Wert der unbestrahlten Kontrolle entsprach. Ab Tag 17 sank der Anteil Caspase-3 positiver Zellen wieder, das Niveau der Ausgangswerte wurde ab Tag 21 wieder erreicht.

Die Behandlung mit den Inhibitoren führte zu einem ähnlichen Verlauf. Während der ersten Bestrahlungswoche blieb der Anteil Caspase-3 positiver Zellen relativ konstant und vergleichbar mit der Kontrolle. Die Glutathion-behandelten Proben erreichten an Tag 9 einen maximalen Markierungsindex von $1,02 \pm 0,51$ Zellen/mm ($0,33 \pm 0,17$ %). In der Fumonisin B1-behandelten Gruppe stieg der Anteil positiver Zellen ab Beginn der zweiten Bestrahlungswoche deutlich an und erreichte an Tag 15 Maxima von $2,58 \pm 0,65$ Zellen/mm ($0,52 \pm 0,28$ %). Nach Ende der Bestrahlung verlief der Anteil Caspase-3 positiver Zellen der Glutathion-behandelten Proben deutlich unter der Kurve der Kontrollgruppe. Ab Tag 21 erreichten alle behandelten Proben das Niveau der Ausgangswerte. Eine detaillierte Zusammenfassung der einzelnen Werte befindet sich im Anhang (10.3.4).

4.6.2.2 Arterielle Gefäße

Die Untersuchung des Gefäßendothels der Zunge zeigte, dass die arteriellen Gefäße aller Proben - unabhängig von Bestrahlung und Behandlung - aktivierte Caspase-3 positive Granula im Endothel aufwiesen (Abb. 30). Eine Quantifizierung dieser Ergebnisse war nicht möglich, da nicht alle histologischen Präparate Querschnitte der arteriellen Gefäße aufwiesen. Es wurden zudem Unterschiede innerhalb eines Entnahmetages in Anzahl und Färbeintensität der Granula im arteriellen Gefäßendothel gefunden.

Aktivierte Caspase-3 positive Granula wurden sowohl in bestrahlten als auch unbestrahlten Proben mit einer vergleichbaren Häufigkeit nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Präparate der mit den Inhibitoren Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin behandelten Tiere aktivierte Caspase-3 positive Granula im Gefäßendothel enthielten (Abb. 30).

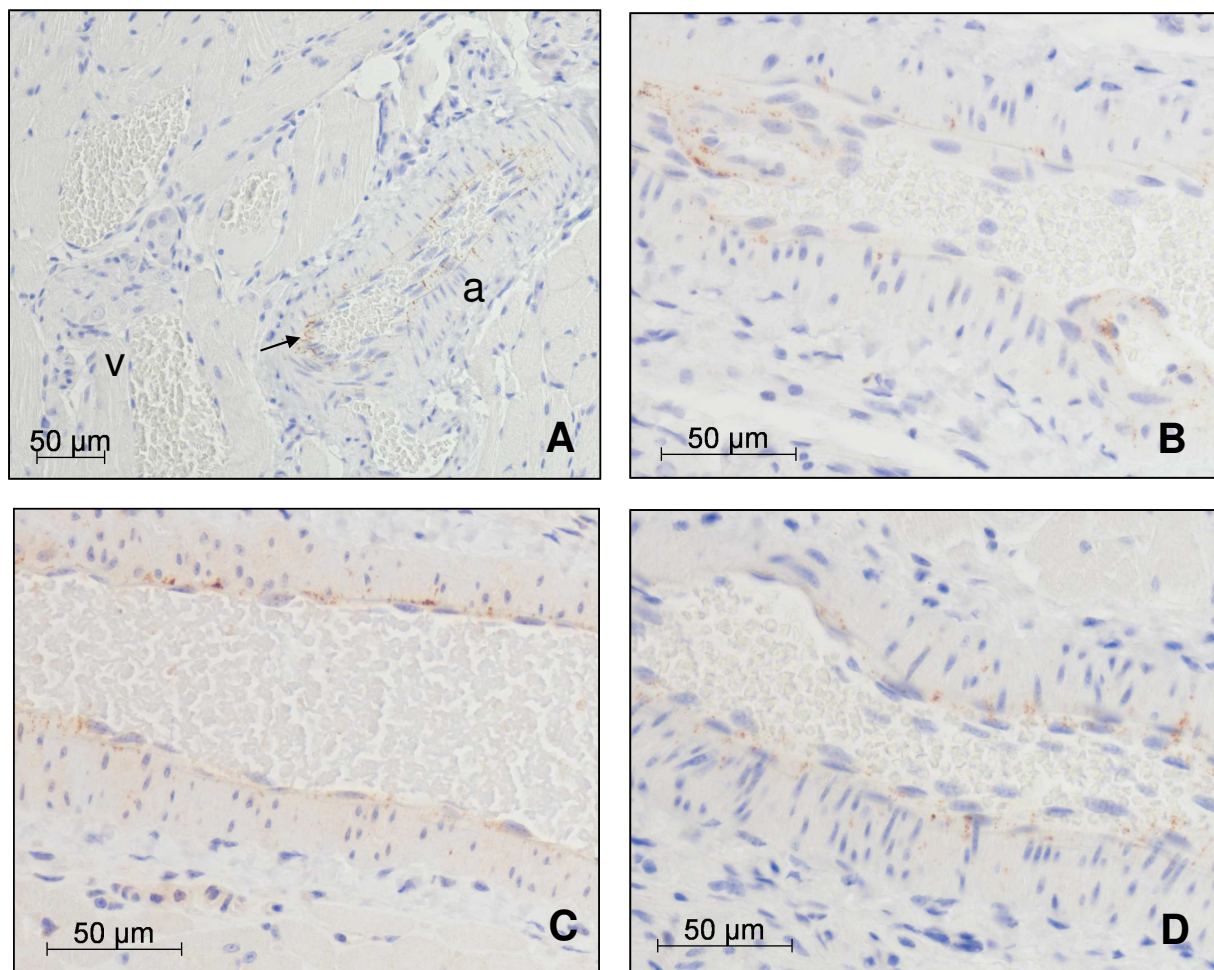


Abb. 30: Caspase-3 positive Granula im Gefäßendothel behandelter und unbehandelter Präparate

Abbildung A zeigt venöse (v) und arterielle (a) Gefäße einer Zunge der Kontrollgruppe (Tag -1) mit aktivierter Caspase-3 positiven Granula im Endothel des arteriellen Gefäßes. Die Granula waren mit einem vergleichbaren Muster auch in den mit den Inhibitoren Glutathion (B), Fumonisin B1 (C) und Desipramin (D) behandelten Präparaten nachweisbar. Die Präparate B bis D stammen von Tag 5.

Um zu prüfen, ob die aktivierte Caspase-3 tatsächlich in den Endothelzellen lokalisiert war, wurden an Serienschnitten immunhistochemische Färbungen mit dem Endothelzellmarker CD31 und aktivierter Caspase-3 durchgeführt. Ein Vergleich der beiden Färbungen zeigte, dass die aktivierte Caspase-3 positiven Granula sich innerhalb des CD31-positiven Areals befanden (Abb. 31). Als Nachweis für die Spezifität der aktivierten Caspase-3- und CD31-Färbung wurde eine Kaninchen-IgG Isotypkontrolle mitgeführt, welche negativ war (Daten nicht gezeigt).

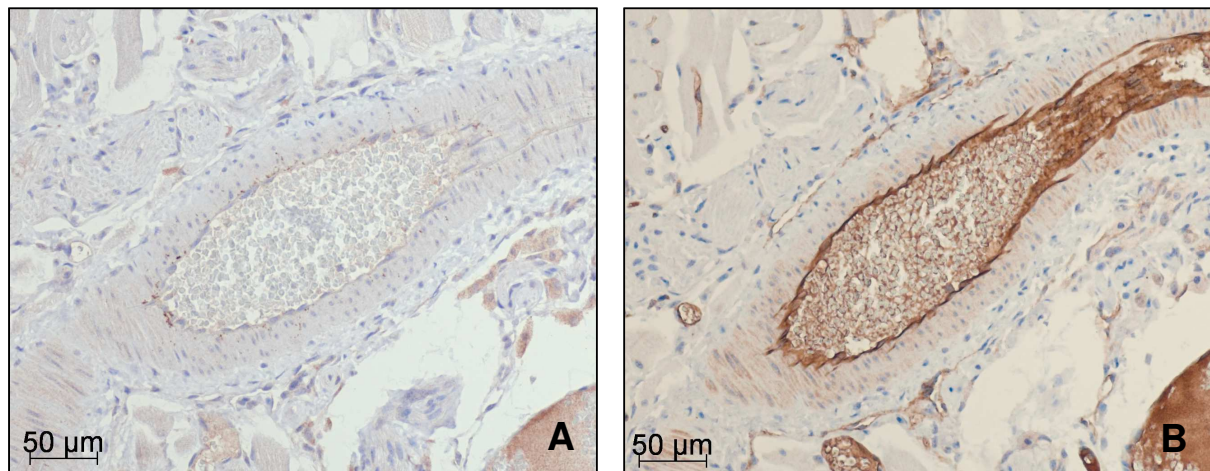


Abb. 31: Nachweis Caspase-3 positiver Granula im Endothel arterieller Gefäße der Zunge

Dargestellt sind exemplarisch die Serienschritte eines mit Fumonisin B1 behandelten Präparates an Tag 3. Abbildung A zeigt den immunhistochemischen Nachweis aktivierter Caspase-3 positiver Endothelzellen. Die immunhistochemische CD31-Färbung zeigt die Lokalisation des Gefäßendothels (B).

4.6.3 Neutrale Sphingomyelinase1

Diese Färbung diente dem Nachweis und der Lokalisation der neutralen Sphingomyelinase1 im Zungenepithel und wurde deshalb nur exemplarisch an unbehandelten Präparaten durchgeführt. Die Isotypenkontrolle wurde mit Maus-IgG durchgeführt. Das Enzym wurde in unbestrahlten Proben schwach im Zytoplasma der Epithelzellen im unteren Teil des Stratum spinosum exprimiert (Abb. 32), im Gefäßendothel wurde neutrale Sphingomyelinase1 immunhistochemisch nicht nachgewiesen. Das Expressionsmuster änderte sich auch während der alleinigen fraktionierten Bestrahlung bis Tag 9 nicht. Ab Tag 11 exprimierten Zellen aller Epithelschichten - außer der Keratinschicht - neutrale Sphingomyelinase1. Allerdings war infolge der strahleninduzierten morphologischen Veränderungen des Epithels eine eindeutige Zuordnung der Zellen zu einer Schicht nicht möglich. Ab Tag 17 war das Expressionsmuster wieder vergleichbar mit dem der unbestrahlten Zungen.

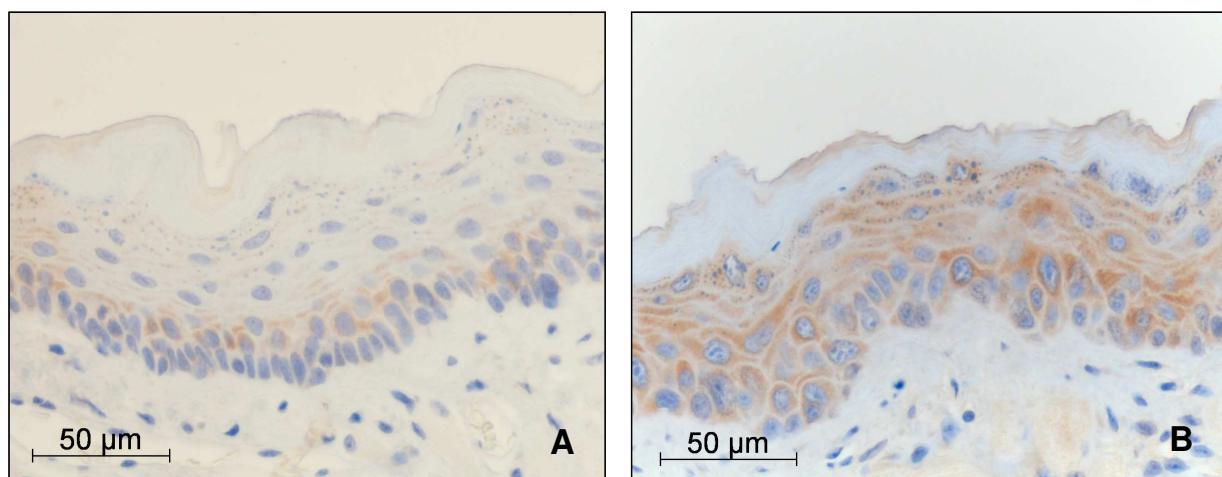


Abb. 32: Immunhistochemischer Nachweis der neutralen Sphingomyelinase1

Abbildung A zeigt die Lokalisation der neutralen Sphingomyelinase1 im unteren Zungenepithel der Maus vor Bestrahlung. Der untere Teil des Stratum spinosum exprimiert das Enzym. Die in Abbildung B gezeigte Aufnahme des unteren Zungenepithels entstand an Tag 11 nach fraktionierter Bestrahlung (5 x 3 Gy/Woche). Das Enzym wurde in allen Epithelschichten außer der Keratinschicht exprimiert.

4.6.4 Ceramide

Ceramide wurden im unbestrahlten Epithel der Zungenunterseite mit einer geringen Färbeintensität in der Keratinschicht (Stratum corneum) immunhistochemisch nachgewiesen (Abb. 33). Die Germinativ- und die Funktionsschicht waren negativ. Die bestrahlten Zungen zeigten ebenfalls nur in der Keratinschicht eine schwache Färbung. Die Behandlung mit den Inhibitoren Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin hatte keinen Einfluss auf die Verteilung von Ceramid im Zungenepithel. Im Gefäßendothel wurden immunhistochemisch keine Ceramide nachgewiesen. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch parallel durchgeführte Färbungen mit Maus-IgM geprüft (Daten nicht gezeigt).

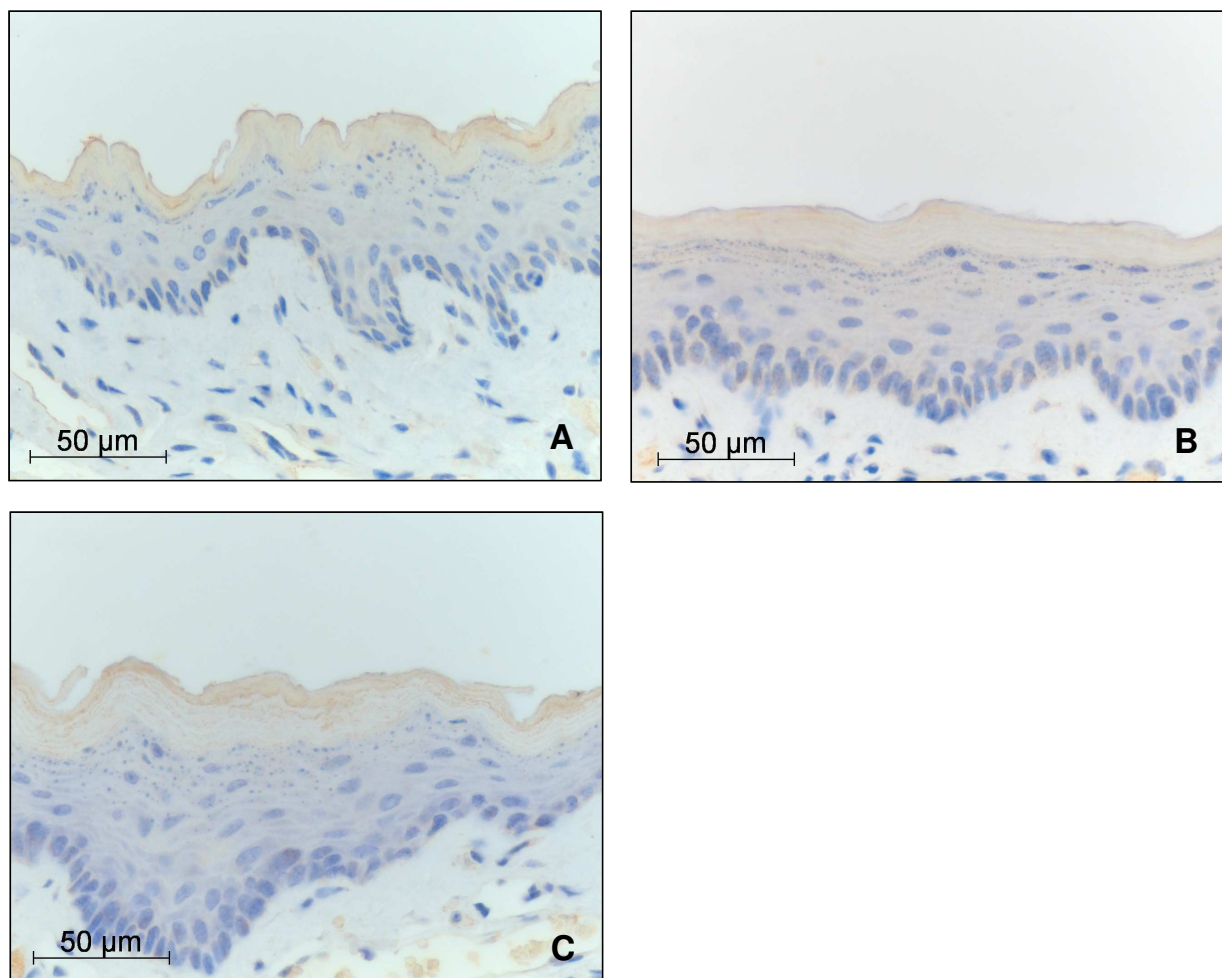


Abb. 33: Immunhistochemischer Nachweis von Ceramiden im Epithel der Zungenunterseite

Dargestellt sind die immunhistochemischen Färbungen von Ceramiden in einer unbestrahlten Zunge (A), während einer fraktionierten Bestrahlung (5 x 3 Gy/Woche) (B) und in Verbindung mit Glutathionbehandlung (C). Die Abbildungen B und C stammen jeweils von Tag 3.

4.6.5 Bcl-2

Die Expression von bcl-2 im unbestrahlten Epithel war sehr gering. Sehr wenige Zellen zeigten eine moderate zytoplasmatische Färbung (Abb. 34). Eine parallel durchgeführte Negativkontrolle mit Ziegen-IgG bestätigte die Spezifität des Antikörpers (Daten nicht gezeigt). Der Verlauf der bcl-2 positiven Zellen je mm Epithel bzw. der prozentuale Anteil dieser Zellen an der Gesamtzellzahl ist in Abb. 35 graphisch dargestellt.

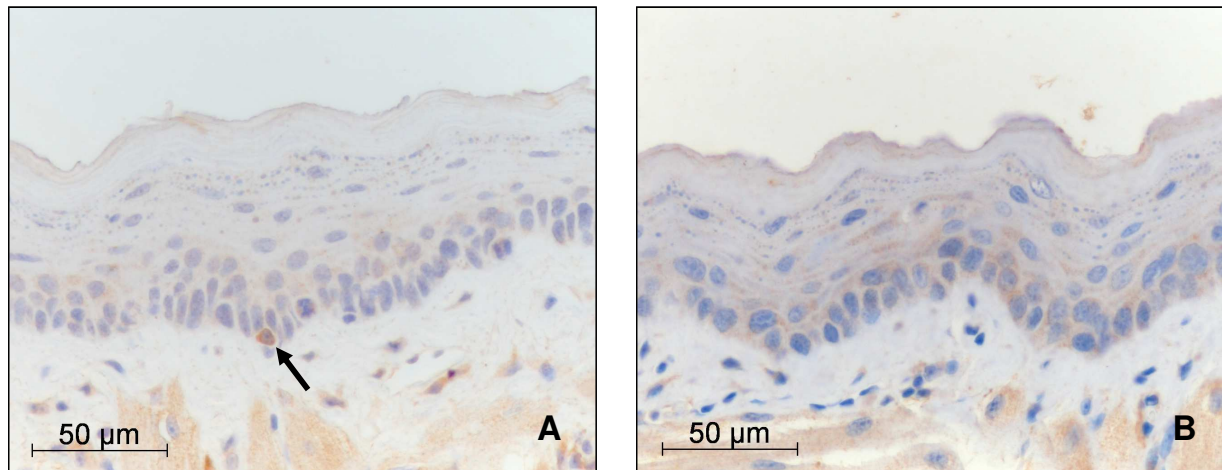


Abb. 34: Immunhistochemischer Nachweis von bcl-2

Abbildung A zeigt bcl-2 positive Zellen in der Germinativschicht des unbestrahlten Epithels der Zungenunterseite. Im Vergleich dazu stellt Abbildung B das Epithel nach fraktionierter Bestrahlung (5 x 3 Gy/Woche) an Tag 11 dar. Es wurden keine bcl-2 positiven Zellen nachgewiesen.

Das unbestrahlte, unbehandelte Epithel der Zungenunterseite enthielt durchschnittlich $0,86 \pm 0,13$ bcl-2 positive Zellen je mm/ Epithellänge; dies entspricht einem Markierungsindex von 0,18 %. In der ersten Bestrahlungswoche sank die Anzahl bcl-2 positiver Zellen der unbehandelten Kontrolle auf $0,5 \pm 0,25$ Zellen/mm ($0,14 \pm 0,07$ %). In der zweiten Bestrahlungswoche reduzierte sich die relative Zahl bcl-2 positiver Zellen nochmals auf ein Sechstel der Werte vor Bestrahlung.

Die Applikation der Inhibitoren Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin führte während der Bestrahlung zu einer mit der Kontrollgruppe vergleichbaren Reduktion des bcl-2 Markierungsindex. In der ersten Bestrahlungswoche sank der bcl-2 Markierungsindex um etwa zwei Drittel (Glutathion, Desipramin) bzw. blieb konstant (Fumonisin B1). Zu Beginn der zweiten Bestrahlungswoche erreichten die mit Desipramin behandelten Proben das Niveau der Ausgangswerte und sanken am Ende der Woche auf die Hälfte der Kontrollwerte. Die Behandlung mit Glutathion und Fumonisin B1 reduzierte den Anteil bcl-2 positiver Zellen um zwei Drittel zu Beginn der zweiten Bestrahlungswoche. Bis zum Ende des Bestrahlungszeitraumes stieg der bcl-2 Markierungsindex der Fumonisin B1- und Desipramin-behandelten Proben wieder auf etwa die Hälfte der Ausgangswerte an.

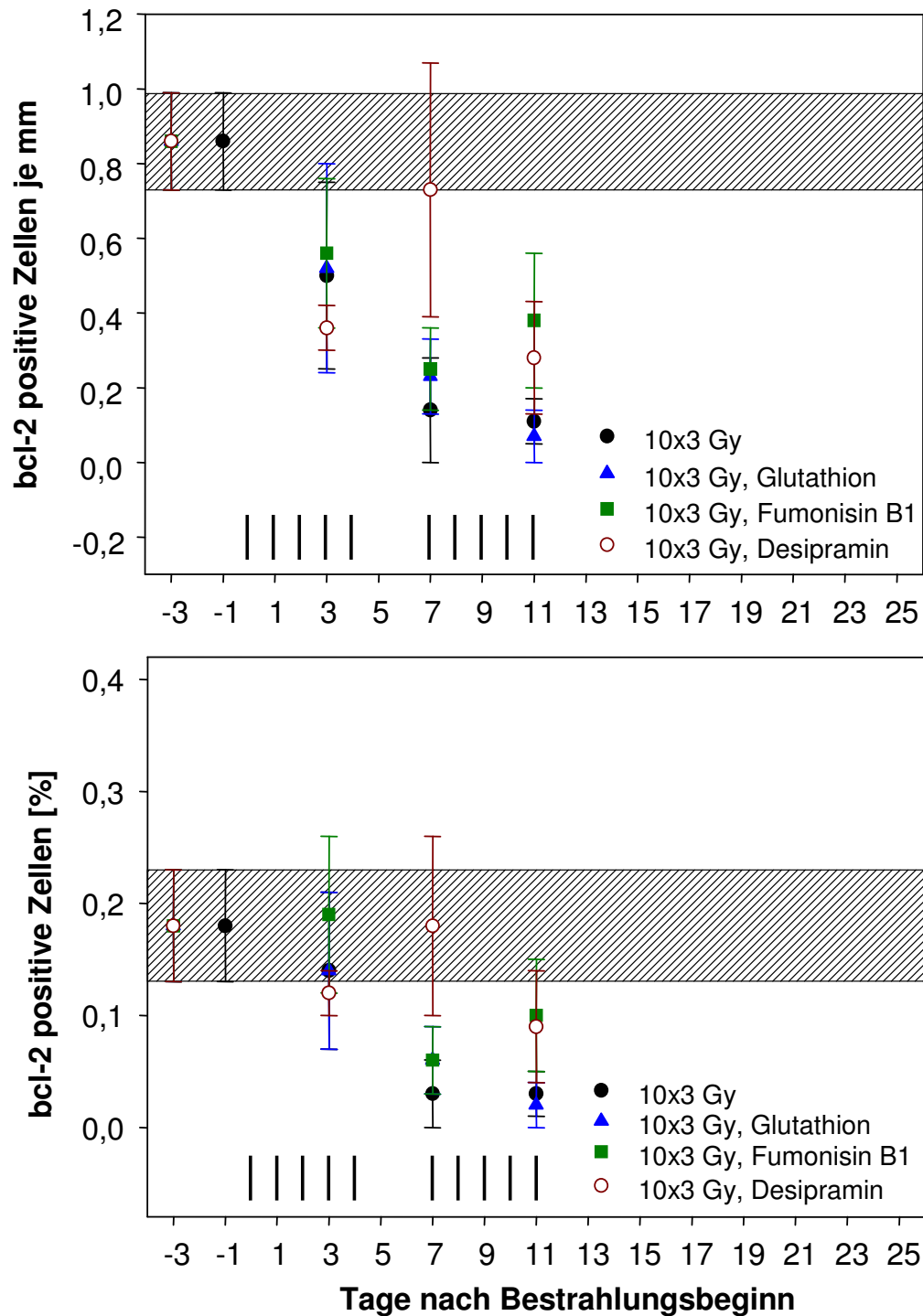


Abb. 35: Anzahl bcl-2 positiver Zellen je mm Zungenepithel (obere Abbildung) und prozentualer Anteil bcl-2 positiver Zellen (untere Abbildung) an der Gesamtzellzahl

Die Abbildung zeigt die absoluten (oben) und relativen (unten) Zahlen bcl-2 positiver Zellen im Verlauf einer fraktionierten Bestrahlung (5 x 3 Gy/Woche). Dargestellt sind die Kontrolle (●) und die mit den Inhibitoren Glutathion (▲), Fumonisin B1 (■), und Desipramin (○) behandelten Proben. Es sind jeweils die Mittelwerte von 5 Tieren/Tag dargestellt. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM). Der schraffierte Bereich zeigt die Kontrolle (n = 20) mit Standardfehler. Das Bestrahlungsprotokoll (I = 3 Gy) ist oberhalb der Abszissen aufgetragen.

4.6.6 Bax

Der immunhistochemische Nachweis von bax war sowohl im Epithel der Zungenunterseite der Kontrollgruppe als auch in bestrahlten und mit Inhibitoren behandelten Zungen negativ. Die Spezifität des Antikörpers wurde durch die zytoplasmatische Färbung von bax in den Drüsenzellen der Glandula sublingualis nachgewiesen (Abb. 36A). Die Isotypenkontrolle der Zungen mit Kaninchen-IgG war negativ (Daten nicht gezeigt).

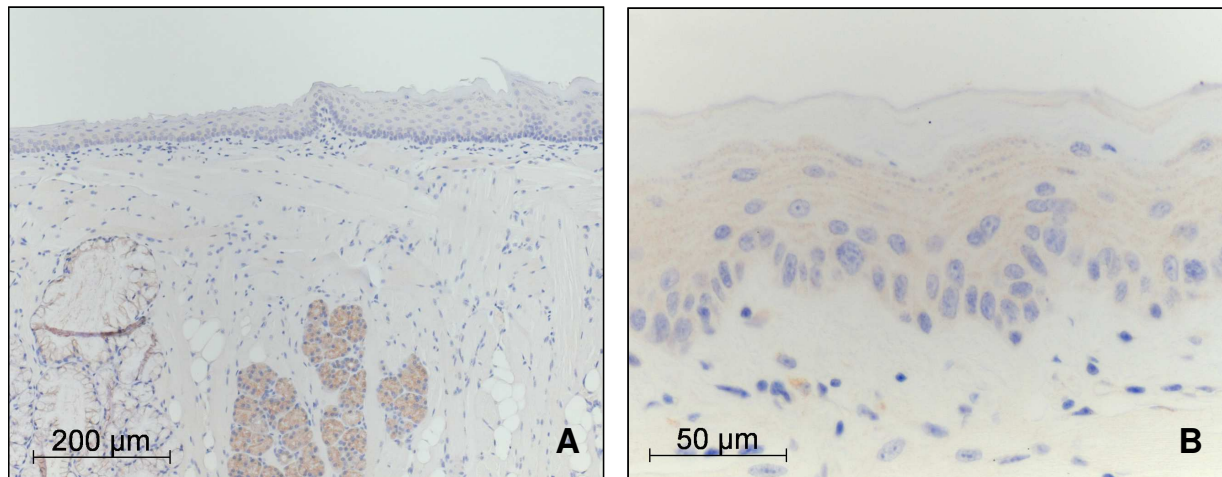


Abb. 36: Immunhistochemischer Nachweis von bax

Abbildung A zeigt das bax-negative Epithel der Zungenunterseite vor Bestrahlung. Die Expression von bax ist in den Zellen der Speicheldrüsen der Zunge positiv. Das Epithel nach fraktionierter Bestrahlung (Tag 11) wird durch Abbildung B illustriert. Der Nachweis von bax ist ebenfalls negativ.

5 Diskussion

5.1 Radiogene Mucositis enoralis

Maligne Tumorerkrankungen im Kopf-Hals-Bereich stehen derzeit in Deutschland an fünfter (Männer) bzw. fünfzehnter Stelle (Frauen) der Häufigkeit von Tumor-Neuerkrankungen (RKI, 2016). Pro Jahr erkranken etwa 13.000 Menschen in Deutschland an malignen Tumoren der Mundhöhle, der Lippen oder des Rachens, wobei Männer um den Faktor 2,6 häufiger betroffen sind als Frauen (RKI, 2016).

Neben chirurgischer Resektion und Chemotherapie steht die alleinige oder adjuvante Strahlentherapie als kurative oder palliative Therapiemöglichkeit zur Verfügung (Galbiatti, et al., 2013; Machtay, et al., 1997). Etwa die Hälfte der Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren erhält im Verlauf ihrer Erkrankung eine Strahlentherapie (ASTRO, 2014; Dörr, et al., 2005). Dabei ist eine Exposition von gesundem Normalgewebe mit signifikanten Dosen trotz sorgfältiger Bestrahlungsplanung nicht zu vermeiden. Dies betrifft Normalgewebe innerhalb und in unmittelbarer Umgebung des Tumors sowie in den Ein- und Austrittskanälen der Strahlung (Dörr, 2009a; Herrmann, et al., 2006).

Die orale Mukositis ist eine schwerwiegende frühe Nebenwirkung der Strahlentherapie von Kopf-Hals-Tumoren. Die äußerst schmerzhaften Ulzerationen der Mundschleimhaut beeinträchtigen das Allgemeinbefinden der Patienten durch eine erschwerte Nahrungsaufnahme beträchtlich und führen zu einer deutlichen Verminderung der Lebensqualität (Dörr, 2010; Elting, et al., 2008; Oskam, et al., 2010). Diese Komplikation ist in einigen Fällen auch ein Grund zur Unterbrechung der Strahlentherapie (Herrmann und Baumann, 2005; Russo, et al., 2008; Vera-Llonch, et al., 2006). Als Folge der dadurch verlängerten Gesamtbehandlungszeit verschlechtern sich die Heilungsaussichten (Bütöf und Baumann, 2013; Herrmann und Baumann, 2005; Herrmann, et al., 2006; Withers, et al., 1988). Das Auftreten einer radiogenen *Mucositis enoralis* ist zudem häufig mit konsekutiven Spätschäden assoziiert (siehe 2.2.3), welche sich klinisch in Form chronischer Ulzerationen, Schleimhautatrophien, Fibrosen und Osteoradionekrosen manifestieren (Dörr, 2010; Dörr und Hendry, 2001; Dörr, et al., 2008). Die Schädigung der epithelialen Barriere ermöglicht das Eindringen opportunistischer Erreger, wodurch das Risiko für sekundäre Infektionen und möglicherweise einer Sepsis steigt. Ein sozioökonomischer Aspekt der radiogenen *Mucositis enoralis* ist – neben den zusätzliche Behandlungskosten - die Hospitalisation der Patienten und die damit verbundenen Kosten im Gesundheitswesen (Elting, et al., 2007; Ling, et al., 2014; Murphy, 2007). Die Pathomechanismen, die zur Entstehung einer radiogenen *Mucositis enoralis* führen, sind sehr komplex und auf molekularer Ebene bisher nicht vollständig geklärt. Es ist belegt, dass an diesem Prozess verschiedene Zellpopulationen des Epithel- und Gefäß-Bindegewebes sowie Makrophagen beteiligt sind (Dörr, et al., 2008). Die

Strahlenexposition aktiviert auf zellulärer Ebene verschiedene Signalkaskaden, welche z.B. Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren (Dörr, et al., 2008).

Die Bedeutung der strahleninduzierten Apoptose als Mechanismus der frühen Strahlenreaktion von Schleimhäuten ist derzeit nicht eindeutig geklärt und wird kontrovers diskutiert (Gudkov und Gleiberman, 2008; Hendry, 2008; Paris, et al., 2001; Schuller, et al., 2007). Ebenfalls diskutiert wird die Beteiligung von Ceramiden an der Strahlenreaktion des Epithels und Endothels (Aureli, et al., 2014; Corre, et al., 2013; Rotolo, et al., 2012). Ceramide entstehen durch die hydrolytische Spaltung des Membranbausteins Sphingomyelin durch das Enzym neutrale Sphingomyelinase (nSMase). Die Aktivierung der nSMase kann u.a. durch den Tumornekrosefaktor (TNF) (Dinesh, et al., 2011; Schütze, et al., 1995) Strahlung (Magnoni, et al., 2002; Watters, 1999; Yabu, et al., 2008) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (Jana und Pahan, 2004) erfolgen. Die Enzymaktivität der nSMase wird durch die reduzierte Form des Tripeptids Glutathion inhibiert (Liu, et al., 1998; Liu und Hannun, 1997).

Hwang et al. konnten zeigen, dass die Inhibition der nSMase mittels Glutathion im Hamster-Tiermodell zu signifikanten Unterschieden in der Ceramid-Expression des Epithels der Mundschleimhaut nach Einzeitbestrahlung (40 Gy) im Vergleich zur Kontrolle führt (Hwang, et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, welchen Einfluss die Applikation von Glutathion im etablierten Modell der Zungenschleimhaut der Maus auf die Ausprägung der oralen Mukositis bei Einzeit- und klinisch relevanter täglich fraktionierter Bestrahlung hat. Die Auswertung umfasste sowohl die klinische Beurteilung der Schleimhaut des Epithels der Zungenunterseite als auch histologische Veränderungen der Mundschleimhaut während täglich fraktionierter Bestrahlung. Der Nachweis von Ceramid und verschiedenen Apoptosemarkern erfolgte mittels immunhistochemischer Färbungen.

5.2 Bedeutung von Glutathion für die radiogene Mucositis enoralis

Glutathion war aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften Gegenstand mehrerer präklinischer und klinischer Studien (Balendiran, et al., 2004; Bier, et al., 1988; Bump und Brown, 1990; Chatterjee, 2013; Estrela, et al., 2006; Sert, et al., 2000). Der positive Einfluss Glutathions auf die Überlebensrate von Mäusen nach Ganzkörperbestrahlung wurde bereits 1950 beschrieben (Chapman und Cronkite, 1950). In der Literatur gibt es insbesondere zur Modulation der radiogenen *Mucositis enoralis* durch Glutathion jedoch sehr wenige Angaben. Hwang et al. konnten in einer präklinischen Studie zeigen, dass Glutathion einen signifikanten Einfluss auf die Expression von Ceramiden in der Mundschleimhaut des Hamsters nach Einzeitbestrahlung mit 40 Gy hat (Hwang, et al., 2005). Studien, in denen gezielt die Aktivität der nSMase1 mittels Glutathion gehemmt wurde, gibt es bis zum jetzigen

Zeitpunkt nicht. Bereits 1950 untersuchten Chapman et al. die Auswirkung einer subkutanen Glutathionapplikation auf die LD₅₀ vor einer Einzeit-Ganzkörperbestrahlung mit Dosen zwischen 5,5 und 11,5 Gy. Die Glutathion-behandelten Tiere zeigten 28 Tage nach einer Ganzkörperbestrahlung einen Anstieg der LD₅₀ von 7,4 Gy (Kontrolle) auf 8,4 Gy (1,6 mg Glutathion pro g Körpergewicht) bzw. 9,5 Gy (4,0 mg Glutathion pro g Körpergewicht). Auch der Gewichtsverlust gegenüber der unbehandelten Kontrolle war niedriger (Chapman und Cronkite, 1950). Die Wirkung von Glutathion in Kombination mit einer Strahlentherapie und/oder Chemotherapie wurde auch bereits in klinischen Studien zur Wirkung von Antioxidantien untersucht (Nakayama, et al., 2011). Evaluert wurden in diesen Studien die Überlebensdauer der Patienten bzw. die Prävention von Nebenwirkungen. In einer weiteren, randomisierten kontrollierten Studie wurde nachgewiesen, dass Glutathion die Darmschleimhaut während einer Bestrahlung des Beckens mit 5 x 2 Gy/Woche und einer Gesamtdosis von 50 Gy schützt. Von den Patienten, die 15 Minuten vor der Bestrahlung des Beckens 1200 mg Glutathion intravenös erhielten, litten nur 28 % an posttherapeutischer Diarrhö (Kontrollgruppe: 52 %) (De Maria, et al., 1992). Die bisherigen Ergebnisse deuten auf einen positiven Effekt Glutathions in Verbindung mit einer Strahlentherapie hin.

5.3 Zungenepithel der Maus als Tiermodell

In der vorliegenden Arbeit wurde das von Dörr etablierte Tiermodell verwendet (Dörr, 1987). Die Beschränkung der klinischen Strahlenreaktion auf ein kleines Testfeld (3 x 3 mm²) der Zungenunterseite ermöglicht eine uneingeschränkte Nahrungsaufnahme durch die Reduktion von Schmerzen der Tiere in Folge der Strahlenreaktion. Das Körpergewicht der Tiere in den vorliegenden Untersuchungen wurde regelmäßig geprüft und dokumentiert, wodurch die geringe Beeinträchtigung der Tiere bestätigt wurde (siehe 4.2.4).

5.3.1 Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen

Das Zungenepithel der Maus vom Stamm C3H/Neu ist hinsichtlich Aufbau, Proliferationskinetik und Pathogenese der Strahlenreaktion der humanen oralen Mukosa vergleichbar (siehe 2.5.3.2) (Dörr, 1997a; Dörr, et al., 1994a). Die Proliferationsaktivität beider Epithelien ist durch einen zirkadianen Rhythmus geprägt (Bjarnason, et al., 1999; Dörr, et al., 1994b; Warnakulasuriya und MacDonald, 1993). Dieser unterliegt der mechanischen Beanspruchung als Zeitgeber (Burholt, 1985; Burholt, 1986). Die Zeitpunkte der Nahrungsaufnahme bestimmen die unterschiedlichen Maxima in der Proliferationsaktivität des murinen und humanen Schleimhautepithels. Die Umsatzzeit des Epithels der Mundschleimhaut der Maus beträgt etwa fünf Tage (Dörr, 1987; Dörr und Kummermehr, 1992) und ist somit vergleichbar mit der Umsatzzeit der humanen oralen Mukosa (Dörr, et al., 1995). Die Strahlenreaktion der humanen und murinen

Mundschleimhaut unterliegt im Wesentlichen vergleichbaren zellbiologischen Prozessen und Signalwegen (Rivina, et al., 2014; Williams, et al., 2010). Im Gegensatz zur humanen Mundschleimhaut ist die murine Mundschleimhaut vollständig keratinisiert. Die orale Mukosa des Menschen ist nur an mechanisch besonders beanspruchten Stellen wie Gaumen und Gingiva verhornend. Dieser Unterschied ist strahlenbiologisch jedoch wenig bedeutsam, da die für die Strahlenreaktion entscheidenden Proliferations- und Differenzierungsvorgänge unabhängig vom terminalen Keratinisierungsgrad der Epitheloberfläche sind (Dörr, 1997a). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse der strahlenbiologischen Untersuchungen des Zungenepithels der Maus sind somit qualitativ auf die humane Mundschleimhaut übertragbar. Allerdings ist eine quantitative Übertragung dieser Daten nur bedingt möglich und erfordert die Absicherung durch weitere experimentelle und klinische Studien.

5.3.2 Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Als quantitativer Endpunkt der Strahlenreaktion wurden ulzerative Läsionen entsprechend einer konfluierenden Mukositis (Grad 3) nach RTOG/EORTC definiert (siehe 2.3.3). Die Dosis-Effekt-Analysen basieren auf der relativen Anzahl der Tiere mit ulzerativen Läsionen im Testfeld auf der Zungenunterseite. In der vorliegenden Arbeit beträgt die ED_{50} (Dosis, bei der bei 50 % der Tiere eine Ulzeration zu erwarten ist) $13,0 \pm 0,7$ Gy. Die Ulkusfrequenz zeigt eine signifikante Abhängigkeit von der applizierten Dosis ($p = 0,0034$). Eine Übersicht der Ergebnisse von Einzeit-Bestrahlungen der eigenen Arbeitsgruppe zwischen 2000 und 2017 zeigt Tab. 22. Der in dieser Arbeit ermittelte ED_{50} Wert ist nur geringfügig höher als die ED_{50} -Werte einiger früherer Arbeiten. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass es nur geringe Variationen zwischen verschiedenen Untersuchern bei der Beurteilung der Ulkusinzidenz gibt (Nickstadt, 2001).

Die aktuellen Untersuchungsergebnisse unterscheiden sich nicht systematisch von früheren Ergebnissen. Geringe Schwankungen sind im Rahmen einer biomedizinischen Datenerfassung zwischen verschiedenen untersuchenden Personen normal.

Die Auswertung der zeitlichen Parameter Latenzzeit und Ulkusdauer als sekundäre Endpunkte unterliegt subjektiven Einflüssen. Zu deren Ausschluss wurde in der vorliegenden Studie die Beurteilung der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut ausschließlich durch die Autorin vorgenommen. Dadurch kann sich die subjektive Komponente maximal als systematischer Fehler manifestieren. Die mittlere Latenzzeit nach Einzeitbestrahlung beträgt in der vorliegenden Arbeit $12,5 \pm 0,9$ Tage, die mittlere Ulkusdauer $3,6 \pm 0,9$ Tage. Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen früherer Arbeiten vergleichbar (Tab. 22).

Tab. 22: Zusammenfassung der Ergebnisse der Einzeit-Bestrahlungsversuche

Referenz	ED ₅₀ ± σ [Gy]	Latenzzeit ± SD (d)	Ulkusdauer ± SD (d)
Dana Großmann, Dissertation 2017	13,0 ± 0,7	12,5 ± 0,9	3,6 ± 0,9
Jessica Schöllner, Dissertation 2015	13,6 ± 1,0	10,6 ± 1,1	3,5 ± 1,0
Veronique Limpert, Dissertation 2014	12,8 ± 1,5	10,6 ± 1,5	3,6 ± 0,9
Stefanie Klinkicht-Bormann, Dissertation 2013	11,5 ± 1,0	12,2 ± 0,5	3,1 ± 0,6
Sophie Schwiedergoll, Dissertation 2013	11,9 ± 1,9	10,6 ± 0,5	3,0 ± 0,8
Tina Schreiber, Dissertation 2012	11,2 ± 1,7	10,9 ± 0,8	2,9 ± 0,8
Annett Siegemund, Dissertation 2011	11,9 ± 3,4	9,6 ± 0,5	2,8 ± 0,4
Ellen Siegemund, Dissertation 2010	11,0 ± 3,4	10,0 ± 0,7	3,4 ± 1,0
Astrid Fehrmann, Dissertation 2010	11,9 ± 1,4	9,6 ± 1,7	2,8 ± 0,7
Karolina Wildermuth, Dissertation 2010	11,5 ± 1,0	12,2 ± 0,5	3,1 ± 0,6
Sylvia Mammeri, Dissertation 2010	12,3 ± 1,0	12,0 ± 0,6	2,6 ± 0,7
Henrike Schmidt, Dissertation 2009	11,5 ± 1,3	11,5 ± 0,5	3,2 ± 0,7
Peggy Sturm, Dissertation 2007	12,9 ± 1,1	10,8 ± 0,8	2,7 ± 0,7
Kathrin Spekl, Dissertation 2007	10,9 ± 0,7	11,6 ± 0,8	2,8 ± 0,6
Katarina Brankovic, Dissertation 2002	10,8 ± 1,3	9,4 ± 0,9	4,4 ± 1,3
Tom Nickstadt, Dissertation 2000	10,6 ± 1,3	8,9 ± 0,7	3,0 ± 0,6

Für die Untersuchungen wurden männliche und weibliche Tiere eingesetzt. Es wurde gezeigt, dass das Geschlecht der Tiere keinen Einfluss auf die Strahlenempfindlichkeit der Mundschleimhaut und den zeitlichen Verlauf der Strahlenreaktion hat (Dörr, 1997a).

5.3.3 Strahlenreaktion der Mundschleimhaut nach fraktionierter Bestrahlung

Die ED₅₀ bei alleiniger fraktionierter Bestrahlung über eine Woche (5 x 3 Gy) mit anschließender Testbestrahlung betrug in der vorliegenden Arbeit 11,1 ± 0,1 Gy, über zwei Wochen (10 x 3 Gy) 12,1 ± 0,1 Gy. Diese Werte sind in guter Übereinstimmung mit den von Limpert gefundenen Werten von 11,2 ± 1,1 Gy (5 x 3 Gy) und 10,9 ± 0,1 Gy (10 x 3 Gy) (Limpert, 2014). Etwas niedriger im Vergleich zu den eigenen Daten sind dagegen die Ergebnisse anderer früherer Arbeiten (Fehrmann, 2010; Klinkicht-Bormann, 2013; Schmidt, 2009; Schwiedergoll, 2012), bei welchen ED₅₀-Werte in einem Bereich von 6,7 ± 2,1 bis 8,6 ± 1,5 Gy (5 x 3 Gy) bzw. von 6,5 ± 1,9 bis 9,4 ± 2,0 gefunden wurden. Für die Zunahme der ED₅₀-Werte in den letzten fünf Jahren gibt es keine schlüssige Erklärung.

Im Vergleich zur Einzeitbestrahlung (13,0 ± 0,7 Gy) waren die ED₅₀-Werte der lokalen Testbestrahlung nach einwöchiger und zweiwöchiger fraktionierter Bestrahlung erniedrigt. Diese Linksverschiebung der Dosis-Effekt-Kurven wird durch die Abnahme der Strahlentoleranz der Mundschleimhaut durch die fraktionierte Strahlendosis verursacht. Trotz der zusätzlichen Applikation von 5 x 3 Gy in der zweiten Bestrahlungswoche wurden bei der zweiwöchigen Fraktionierung gegenüber der einwöchigen Fraktionierung keine Unterschiede in den Dosis-Effekt-Kurven festgestellt. Dies beruht auf den am Ende der ersten

Bestrahlungswoche beginnenden Repopulierungsvorgängen im Epithel (siehe 2.7.3) (Dörr, 1997b; Dörr und Kummermehr, 1991).

Die Latenzzeiten bis zur Ulkusdiagnose (bezogen auf den Tag der Testbestrahlung) waren nach fraktionierter Bestrahlung (5 x 3 Gy: $7,6 \pm 1,0$ Tage; 10 x 3 Gy: $8,2 \pm 0,4$ Tage) kürzer als nach Einzeitbestrahlung ($12,5 \pm 0,9$ Tage). Dieser Effekt wird durch den bereits während der fraktionierten Bestrahlung beginnenden Zellverlust verursacht. Durch diese Vorschädigung des Epithels ist der Zeitraum bis zum vollständigen Zellverlust nach der abschließenden Testbestrahlung im Vergleich zur alleinigen Einzeitbestrahlung kürzer (Dörr, 1987; Dörr, 1997a; Fehrmann, 2010). Die mittlere Ulkusdauer nach ein- und zweiwöchiger Fraktionierung mit abschließender Testbestrahlung (5 x 3 Gy: $3,7 \pm 0,7$ Gy, 10 x 3 Gy: $3,2 \pm 0,6$ Gy) ist vergleichbar mit derjenigen nach alleiniger Einzeitbestrahlung ($3,6 \pm 0,9$ Gy). Dies wurde bereits in früheren Arbeiten mit dem gleichen Tiermodell beschrieben (Schreiber, 2012).

5.4 Applikation und Verträglichkeit von Glutathion

Die Glutathion-Dosis von 1 μmol pro Injektion wurde anhand von Angaben in der Literatur gewählt (Hwang, et al., 2005). Es gibt bisher keine Hinweise, dass eine tägliche Applikation von Glutathion in dieser Dosierung bei der Maus mit Nebenwirkungen verbunden ist. Für diese Arbeit wurde die Verträglichkeit von Glutathion zusätzlich durch die alleinige Gabe an 28 aufeinander folgenden Tagen an fünf Tieren geprüft (4.1). Die Applikation von Glutathion erfolgte subkutan in die Nackenfalte. Bei der Beurteilung des Allgemeinzustands der Tiere wurde während des gesamten Behandlungszeitraums keine Beeinträchtigung festgestellt. Die maximale Gewichtabnahme von 10,5 % (Tag 8) in diesem Zeitraum ist möglicherweise auf Stressreaktionen der Tiere bedingt durch das tägliche Handling zurückzuführen.

5.5 Modulation der radiogenen Mucositis enoralis durch Glutathion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig der Einfluss von Glutathion auf die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut bei fraktionierter Bestrahlung im Mausmodell untersucht. Die Applikation erfolgte nach verschiedenen, klinisch relevanten Behandlungsprotokollen in Kombination mit Einzeit- und fraktionierter Bestrahlung. Zu dieser Fragestellung erschien 2005 eine Publikation (Hwang, et al., 2005), welche allein den Einfluss von Glutathion bei Bestrahlung mit Einzeldosen von 40 Gy untersuchte.

5.5.4 Wirkung von Glutathion bei Einzeitbestrahlung

Die Behandlung mit Glutathion von Tag -3 bis zur Erstdiagnose bzw. vollständigen Heilung der Ulzerationen in Kombination mit Einzeitbestrahlung zeigte keine signifikanten Unterschiede der Dosis-Effekt-Kurven gegenüber der unbehandelten Kontrolle (siehe 4.3, Tab. 17). Die zeitlichen Parameter Latenzzeit und Ulkusdauer blieben von der Glutathionbehandlung ebenfalls unbeeinflusst. Die Daten zeigen, dass Glutathion in der verwendeten Dosierung mit dem beschriebenen Zeitschema keinen Einfluss auf die Strahlenreaktion der oralen Mukosa hat.

Auch Hwang et al. konnten keinen signifikanten Unterschied beim Auftreten einer oralen Mukositis zwischen Kontrolle (34 %) und glutathionbehandelten Tieren (28 %) nach Einzeitbestrahlung mit 40 Gy feststellen (Hwang, et al., 2005). Ein direkter Vergleich der ED₅₀-Werte der vorliegenden Arbeit mit den von Hwang et al. (2005) publizierten Ergebnissen ist nicht möglich, da in diesem Fall der Schweregrad der Mukositis mittels eines 6-Punkte Scoring-Systems erfasst wurde (Sonis, 2002).

5.5.5 Wirkung von Glutathion bei fraktionierter Bestrahlung

Bisher gibt es in der Literatur keine Daten zur Wirkung von Glutathion auf die radiogene *Mucositis enoralis* bei fraktionierter Bestrahlung. Die Diskussion in diesem Abschnitt bezieht sich deshalb ausschließlich auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Wurde Glutathion in Verbindung mit einer einwöchigen fraktionierten Bestrahlung appliziert, konnte eine signifikante Änderung der ED₅₀ für die abschließende Testbestrahlung in den Behandlungsarmen mit Glutathiongabe von Tag -3 bis zur Erstdiagnose und bis zur Heilung festgestellt werden. Die Erhöhung der ED₅₀ um 2,0 bzw. 3,5 Gy entsprach der Steigerung um den Faktor 1,3 bzw. 1,2. Bei Applikation von Glutathion von Tag -3 bis Tag 7 zeigte sich keine signifikante Änderung der ED₅₀ (siehe 4.4.2, Tab. 19). Latenzzeit und Ulkusdauer wurden durch die Glutathionapplikation nicht beeinflusst.

Die Applikation von Glutathion während einer zweiwöchigen fraktionierten Bestrahlung führte zu keiner signifikanten Veränderung der ED₅₀ und der Latenzzeit. Die Ulkusdauer der mit Glutathion behandelten Tiere war signifikant länger ($p < 0,001$) als die der unbehandelten Kontrollgruppe. Allerdings hat der Unterschied in der Ulkusdauer keine klinische Relevanz (Dörr, pers. Mitteilung).

5.5.6 Wirkmechanismus von Glutathion

Eine mögliche Ursache für den mukoprotektiven Effekt der Glutathionbehandlung in Verbindung mit einer einwöchigen fraktionierten Bestrahlung kann eine Stimulation von Repopulierungsprozessen – zusätzlich zur strahleninduzierten Regeneration - sein. Dazu ist es offensichtlich nötig, dass die Applikation von Glutathion über den Zeitraum der Bestrahlung hinaus, mindestens bis zur Diagnose der Ulzerationen, erfolgt. Eine Gabe nur während der Bestrahlung bleibt ohne Wirkung. Somit kann eine Vorverlagerung des Beginns der Regenerationsprozesse, der bei alleiniger Bestrahlung am Ende der ersten Woche liegt, ausgeschlossen werden. Die fehlende Wirkung des Glutathions in Verbindung mit zweiwöchiger Bestrahlung wäre in diesem Fall dadurch zu erklären, dass bereits die fortgesetzte Bestrahlung alleine zu einer maximalen Regeneration führt, und so kein zusätzlicher Effekt des Glutathions mehr manifest werden kann.

Ein weiterer potentieller Wirkmechanismus könnte auf der antioxidativen Wirkung des Glutathions beruhen. Jedoch müsste sich die Wirkung dann in allen experimentellen Protokollen manifestieren, so dass dieser Mechanismus auszuschließen ist.

Es ist weiterhin auszuschließen, dass die ceramidvermittelte Apoptose durch radiogene Aktivierung der nSMase1 ein zentraler Mechanismus der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut ist. Wäre dies der Fall, so müsste die mukoprotektive Wirkung ebenfalls in allen Versuchsarmen nachweisbar sein.

5.5.7 Weitere tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Inhibitoren des Sphingomyelin-Signalweges auf die orale Mukositis

Präklinische Studien aus der eigenen Arbeitsgruppe zur Wirkung von Inhibitoren des Sphingomyelin-Signalweges auf die radiogene *Mucositis enoralis* zeigten, dass sowohl die Hemmung der sauren Sphingomyelinase mittels Desipramin als auch der Ceramidsynthase mittels Fumonisin B1 keinen systematischen Einfluss auf die Strahlentoleranz der oralen Schleimhaut haben (Limpert, 2014; Mey, Diss. med. dent. TU Dresden, in Vorbereitung).

Im Gegensatz zu einer Behandlung mit Glutathion führten Desipramin und Fumonisin B1 bei einer zweiwöchigen fraktionierten Bestrahlung zu einem signifikanten Anstieg der isoeffektiven Dosen, Latenzzeit und Ulkusdauer blieben unbeeinflusst. Die erhöhte Strahlentoleranz wird jedoch nicht auf eine Inhibition der Synthese von Ceramiden zurückgeführt, da in diesem Fall ebenfalls eine Erhöhung der isoeffektiven Dosen in allen Protokollen auftreten müsste. Da auch keiner der Inhibitoren einen Einfluss auf die Strahlentoleranz in Verbindung mit einer Einzeitbestrahlung hatte, ist die ceramidvermittelte Apoptose als Ursache der radiogenen *Mucositis enoralis* auszuschließen. Hwang et al. wiesen dagegen nach, dass die Applikation von Fumonisin B1 in Verbindung mit einer

Einzeitbestrahlung mit 40 Gy zu einer signifikanten Reduktion der Häufigkeiten schwerer Ulzerationen führt (Hwang, et al., 2005). Dieser Unterschied kann auch darauf zurückzuführen sein, dass Hwang sowohl ein anderes Tiermodell nutzte (Backentasche des Hamsters) als auch eine deutlich höhere Strahlendosis applizierte.

5.6 Histologische Untersuchungen

5.6.1 Zellzahl und Dicke des unbehandelten Epithels

Die mittlere Gesamtzellzahl im unbehandelten, unbestrahlten Epithel betrug 482 ± 10 Zellen/mm Epithellänge. Der Anteil von Zellen in der Germinativschicht war 70 % (336 ± 8 Zellen/mm Epithellänge) (siehe 4.5.1). Diese Werte bestätigen die Ergebnisse von Dörr und Kummermehr, welche eine Gesamtzellzahl von 430 ± 12 , davon 71 % der Zellen in der Germinativschicht gefunden haben (Dörr und Kummermehr, 1991). Es konnte damit weiterhin gezeigt werden, dass die Zellzahl je Millimeter Epithellänge der Zungenunterseite auch über einen längeren Zeitraum und bei Änderung verschiedener exogener Faktoren (Futterzusammensetzung, Haltungsbedingungen) konstant bleibt. Vergleichbare Werte zur Zellzahl je Millimeter Epithellänge wurden auch von Schreiber (2012) mit 406 ± 12 und Klammt (2005) mit 519 ± 21 publiziert (Klammt, 2005; Schreiber, 2012). Auch die relative Zahl der Zellen in der Germinativschicht ist in der vorliegenden Arbeit vergleichbar mit den Werten von Schöllner (72 %) (Schöllner, 2015), Klinkicht-Bormann (73 %) (Klinkicht-Bormann, 2013), Fehrmann (75 %) (Fehrmann, 2010), Kerres (72 %) (Kerres, 2009) und Dörr (71 %) (Dörr und Kummermehr, 1991).

Die durchschnittliche absolute Dicke des Gesamtepithels betrug $78 \pm 2 \mu\text{m}$. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit den von Schöllner (Schöllner, 2015) ($80 \pm 3 \mu\text{m}$) und Schwiedergoll (Schwiedergoll, 2012) ($76 \pm 4 \mu\text{m}$) gefundenen Werten. Die prozentualen Anteile der einzelnen Epithelschichten (siehe 4.5.1) sind ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den Werten der Arbeiten von Schöllner (Schöllner, 2015), Schreiber (Schreiber, 2012) und E. Siegemund (Siegemund, 2010).

5.6.2 Einfluss einer Bestrahlung mit 5 x 3 Gy/Woche mit/ ohne einer zusätzlichen Behandlung auf die epitheliale Zellzahl

Alleinige Bestrahlung (Versuch H0)

Die alleinige Bestrahlung mit 5 x 3 Gy/Woche führte bis zu Tag 5 zu einer maximalen Reduktion der Gesamtzellzahl auf 68 % der Ausgangszellzahl. Dieser Wert bestätigt die Beobachtungen früherer Arbeiten am gleichen Tiermodell, die ebenfalls innerhalb der ersten fünf Tage während einer fraktionierten Bestrahlung mit 2,5 - 3,5 Gy/ Fraktion eine Reduktion der Zellzahl auf ca. 70 % beschreiben (Dörr, 1994; Fehrmann, 2010; Schreiber, 2012; Schwiedergoll, 2012). Trotz fortgesetzter Bestrahlung blieb die Zellzahl in der zweiten Behandlungswoche bei ca. 70 %. Dies ist auf die zum Ende der ersten Bestrahlungswoche einsetzenden Repopulierungsvorgänge (siehe 2.7.3) zurückzuführen, welche die weitere Zelldepletion kompensieren (Dörr, 2009c; Fehrmann, 2010). Die erhöhte Gesamtzellzahl nach Ende der fraktionierten Bestrahlung über zwei Wochen gegenüber den Ausgangswerten war ebenfalls eine Folge kompensatorischer Repopulierungsvorgänge. Innerhalb der verschiedenen epithelialen Kompartimente gab es Unterschiede in der Veränderung der Zahlen: in der funktionellen Schicht wurde die Zellzahl stärker reduziert (60,0 % des unbehandelten Epithels an Tag 5) als in der Germinativschicht (72,1 % des unbehandelten Epithels an Tag 5). Bei einer Umsatzzeit des Gesamtepithels von ca. fünf Tagen ist das Minimum der Zellzahl in der funktionellen Schicht auf die vorhergehende Hemmung der Teilungsaktivität der Zellen der Germinativschicht zurückzuführen.

Fraktionierte Bestrahlung mit Glutathion – Behandlung (Versuch H1)

Während der fraktionierten Bestrahlung in Kombination mit einer Glutathionbehandlung ging die Gesamtzellzahl auf ein Minimum von 69 % - bezogen auf die Ausgangswerte - an Tag 5 zurück; dies entspricht der Veränderung bei alleiniger Bestrahlung. Bis Tag 11 war der Kurvenverlauf nahezu identisch demjenigen der unbehandelten Kontrolle, ab Tag 13 stiegen die Zellzahlen der mit Glutathion behandelten Tiere deutlich stärker und auch rascher als die der Kontrolle an. Dieser Effekt wurde überwiegend durch die Zunahme an Zellen in der Germinativschicht verursacht. Ein möglicher Mechanismus dafür könnte eine allgemeine Stimulation der Zellteilungsaktivität sein.

Fraktionierte Bestrahlung mit Fumonisin B1 – Behandlung (Versuch H2)

Die Behandlung mit Fumonisin B1 während der fraktionierten Bestrahlung über zwei Wochen führte zu einer stärkeren Reduktion der Gesamtzellzahl (57,6 % an Tag 5) gegenüber der unbehandelten Kontrolle (68,4 % an Tag 5). Diese Unterschiede beruhten hauptsächlich auf Veränderungen der Zellzahlen in der Germinativschicht, in der funktionellen Schicht war die

Zelldepletion vergleichbar. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Fumonisin B1 die abortiven Teilungen der geschädigten Zellen hemmt. Eine antiproliferative Wirkung von Fumonisin B1 wurde von Tolleson et al. an Keratinozyten *in vitro* nachgewiesen; der IC₅₀ für das klonogene Wachstum von Keratinocyten ist 10⁻⁵ M (Tolleson, et al., 1996).

Fraktionierte Bestrahlung mit Desipramin - Behandlung (Versuch H3)

Der Verlauf der epithelialen Zellzahlen während der fraktionierten Bestrahlung in Kombination mit einer Desipraminbehandlung war vergleichbar mit dem der alleinigen Bestrahlung. Lediglich ab Tag 17 erreichten die Zellzahlen der Germinativschicht wieder die Ausgangswerte (100,3 %) und lagen damit deutlich unter den Werten der alleinigen Bestrahlung (119,6 %). Möglicherweise steht dieser Effekt in Zusammenhang mit zytotoxischen Eigenschaften von Desipramin. Arimochi und Morita zeigten, dass Desipramin *in vitro* ab einer Konzentration von 25 µM das Überleben von humanen Kolonkarzinomzellen erheblich reduziert (Arimochi und Morita, 2006).

5.6.3 Einfluss einer Bestrahlung mit 5 x 3 Gy/Woche mit/ ohne einer zusätzlichen Behandlung auf die Epitheldicke

In der Literatur gibt bisher keine Angaben zum Einfluss von Glutathion, Desipramin und Fumonisin B1 auf histologische Parameter der murinen oralen Mukosa. Die Diskussion bezieht sich im Folgenden ausschließlich auf die eigenen Ergebnisse.

Alleinige Bestrahlung (Versuch H0)

Bei alleiniger fraktionierter Bestrahlung (10 x 3 Gy) wurden keine systematischen Abweichungen der Dicke des Gesamtepithels gegenüber dem Wert vor Bestrahlung festgestellt. Bei Betrachtung der einzelnen Epithelkompartimente wurden dagegen deutliche Zu- und Abnahmen beobachtet. Innerhalb der Keratinschicht kam es zu der größten Dickenzunahme, das Maximum (141 %) wurde an Tag 7 erreicht. Die Zunahme der Keratinschicht wurde durch eine gesteigerte terminale Differenzierung der Zellen in der Germinativschicht in Folge der Bestrahlung verursacht (Hyperkeratose). Gleichzeitig erreichte die funktionelle Schicht an diesem Tag nur 74 % des Ausgangswertes. Zum Ende des Beobachtungszeitraumes (Tag 25) wurden wieder die Ausgangswerte erreicht. Die Ursache für die relative Konstanz der Epitheldicke bei gleichzeitiger Abnahme der Gesamtzellzahl war eine Zunahme des Zellvolumens auf ca. 130 % (Dörr, 1997a; Kerres, 2009; Schreiber, 2012).

Fraktionierte Bestrahlung mit Glutathion (Versuch H1)

Bei der Behandlung mit Glutathion zeigte sich bereits an Tag 1 eine Abnahme der Dicke des Gesamtepithels auf 78 % (Abb. 16), welche gleichermaßen auf eine Reduktion aller Kompartimente des Epithels zurückzuführen ist. Im Vergleich zur Kontrolle und den anderen Behandlungsarmen war die Reduktion der Germinativschicht auf 72 % des Ausgangswertes bei Behandlung mit Glutathion am stärksten ausgeprägt. Eine vergleichbare Reduktion an Tag 1 wurde bereits von Fehrmann beschrieben, allerdings für das unbehandelte Epithel (Fehrmann, 2010). Auf dieses Minimum folgte an Tag 5 eine Steigerung der Epitheldicke auf 119 %. Diese basierte hauptsächlich auf einer Dickenzunahme der Keratinschicht (157 %), welche stärker als die der Kontrolle erfolgte. Gegen Ende des Beobachtungszeitraums normalisierten sich die Messwerte der Schichtdicke der Keratinschicht wieder auf das Ausgangsniveau.

Fraktionierte Bestrahlung mit Fumonisin B1 (Versuch H2)

Bereits an Tag 1 war eine deutliche Zunahme der Keratinschicht auf 140 % sichtbar. Zu Beginn der zweiten Bestrahlungswoche erreichte die Keratinschicht eine maximale Dicke von 157 % und war damit vergleichbar mit der Keratinschicht bei Glutathionbehandlung. Während des gesamten Beobachtungszeitraums war die Keratinschicht bei Fumonisinbehandlung dicker als die der Kontrollgruppe. Die Schichtdicken der Funktions- und Germinativschicht blieben bei Behandlung mit Fumonisin B1 im Vergleich zur Kontrolle überwiegend unverändert.

Fraktionierte Bestrahlung mit Desipramin (Versuch H3)

Es wurde gezeigt, dass die Behandlung mit Desipramin ebenfalls zu einer früheren und stärkeren Zunahme der Keratinschicht gegenüber der Kontrolle während der ersten Bestrahlungswoche führt. Eine Zunahme der Schichtdicke war auch in der funktionellen Schicht zu beobachten. Da diese keine Korrelation mit den entsprechenden Zellzahlen zeigte, kann auf eine Zunahme des Zellvolumens geschlossen werden.

5.7 Immunhistochemische Untersuchungen

5.7.1 Bedeutung von Proliferationsvorgängen

Zur Beurteilung der Proliferationsaktivität des Epithels wurde der Proliferationsmarker Ki-67 immunhistochemisch im Epithel nachgewiesen. Der Antikörper Ki-67 (TEC 3) reagiert mit einem nukleären Antigen, welches von Zellen in der G1-, M-, S- und G2-Phase exprimiert wird (Gerdes, et al., 1984).

Der Anteil Ki-67-positiver Zellen in unbehandelten Zungenpräparaten (Markierungsindex) war mit 30 % nahezu identisch mit den von Kerres gefundenen Ergebnissen (Kerres, 2009). Der von Fehrmann gefundene Markierungsindex war mit 24 % etwas niedriger (Fehrmann, 2010). In diesen Arbeiten wurde der gleiche Antikörper verwendet (Clone TEC-3, monoclonal rat anti mouse Ki-67 Antigen, Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass nach der ersten Fraktion mit 3 Gy der Anteil proliferierender Zellen auf 6 % reduziert wird. Bereits ab Tag 3 nahm die proliferative Aktivität wieder zu und lag an Tag 7 wieder über dem Ausgangswert.

Die Behandlung mit Glutathion, Fumonisin B1 oder Desipramin hatte keinen systematischen Einfluss auf die Proliferationsrate des Epithels der Zungenunterseite.

5.7.2 Expressionsmuster von nSMase1 und Ceramid

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der nSMase1 in der oralen Mukosa der Maus immunhistochemisch nachgewiesen. Das Enzym nSMase1 wird nur von Zellen im unteren Teil der Stratum spinosum der murinen Mundschleimhaut exprimiert, das submuköse Gefäßendothel ist negativ. Es gibt in der Literatur sehr wenige vergleichbare Daten zur Expression der nSMase1 in der Mundschleimhaut. In der Datenbank *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000135587-SMPD2/tissue/oral+mucosa>; Aufruf am 02.02.2015) wird die Expression der nSMase1 in der humanen oralen Mukosa mittels des polyklonalen Kaninchen-Antikörpers HPA018125 der Firma Sigma-Aldrich illustriert. Die Färbung ist in dem Fall deutlich stärker, alle Epithelschichten außer der Basalzellschicht zeigten eine Expression der nSMase1. Es lässt sich daraus schließen, dass nSMase1 erst im Verlauf der Differenzierung der Epithelzellen exprimiert wird. Dass in der eigenen Arbeit nSMase1 nicht in der funktionellen Schicht der Kontrollproben nachgewiesen wurde, ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Antikörper zurückzuführen.

In der Literatur wird die Lokalisation der nSMase1 im Endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat beschrieben (Tomiuk, et al., 2000; Yabu, et al., 2008; Yabu, et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde die zytoplasmatische Expression der nSMase1 im Epithel der murinen Mundschleimhaut mittels Lichtmikroskop gezeigt.

Während der fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy änderte sich das Expressionsmuster der nSMase1 im Epithel der Mundschleimhaut. Das Enzym wurde ab Tag 11 in den Zellen aller Schichten der oralen Mukosa nachgewiesen, ab Tag 17 entsprach das Expressionsmuster wieder dem der unbestrahlten Kontrolle (siehe 4.6.3). Es ist anzumerken, dass die immunhistochemische Analyse des Expressionsmusters keinen Aufschluss über die Aktivität der nSMase1 gibt. Hierzu wäre eine Quantifizierung der Enzymaktivität nötig gewesen, welche jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war.

Das Sphingolipid Ceramid wurde im unbehandelten Epithel der Mundschleimhaut in der Keratinschicht (*Stratum corneum*) detektiert. Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur (Uchida, 2014). Ceramid ist - neben Cholesterol und freien Fettsäuren – eine Komponente der interzellulären Lipidmatrix der Keratinschicht, deren Anteil 43 – 46 % der Gesamtlipide beträgt (Di Marzio, et al., 1999; Elias, et al., 1988; Yardley und Summerly, 1981). Während der fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy konnten immunhistochemisch ebenfalls keine Ceramide in der Germinativ- oder funktionellen Schicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den von Hwang et al. publizierten Daten (Hwang, et al., 2005). Weitere Publikationen zur Bildung von Ceramiden in der oralen Mukosa nach Bestrahlung liegen nicht vor. Bei der Durchführung der Versuche gab es Unterschiede hinsichtlich der verwendeten Tierspezies, Strahlendosis und des Ceramid-Antikörpers. Möglicherweise war die fraktionierte Strahlendosis von 10 x 3 Gy im Vergleich zu einer Einzeldosis von 40 Gy bei Hwang et al. nicht effektiv, um die Bildung von Ceramid in den tieferen Epithelschichten zu induzieren.

Die zusätzliche Behandlung mit den Inhibitoren Glutathion, Desipramin und Fumonisin B1 hatte keinen Einfluss auf die Expression von nSMase1 und Generierung von Ceramiden im Epithel der oralen Mukosa.

5.7.3 Apoptose

Im Epithel der Mundschleimhaut wurden in der vorliegenden Arbeit apoptotische Zellen mit der immunhistochemischen Detektion aktivierter („cleaved“) Caspase-3 erfasst. Der Nachweis dieser Effektorcaspase ist assoziiert mit der irreversiblen Aktivierung der Signalkaskade der Apoptose. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten in Übereinstimmung mit der Literatur, dass spontane Apoptosen in der unbehandelten Mundschleimhaut äußerst selten und überwiegend in der Basalzellschicht des Epithels nachweisbar sind (Hague, et al., 2004; Potten, 2001). Der in der vorliegenden Arbeit ermittelte Markierungsindex für aktivierte Caspase-3 in der unbestrahlten Kontrolle betrug 0,04 %. In Verbindung mit einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy wurde ab Tag 13 die Zunahme aktivierter Caspase-3 positiver Zellen um den Faktor 10 beobachtet. Dieser sehr späte Anstieg von aktivierter Caspase-3 positiven Zellen kann ursächlich auf die

Bestrahlung zurückgeführt werden; allerdings ist der Markierungsindex von 0,4 % zu gering, um für die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut von Relevanz zu sein.

Die Zungenpräparate der mit den Inhibitoren des Sphingomyelin-Signalweges (Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin) behandelten Tiere zeigten gegenüber den nur bestrahlten Kontrollen keine Unterschiede im Caspase-3 Markierungsindex.

Untersuchungen an Kulturen von T-Lymphozyten und Plattenepithelkarzinomzellen zeigten, dass das Spaltprodukt der Caspase-3 in einem Zeitraum von 8 bis 48 Stunden nach einer Bestrahlung mit 10 Gy nachweisbar ist (Alphonse, et al., 2002). In humanen Keratinozyten wurde nach Bestrahlung mit 20 Gy ebenfalls eine Zunahme an aktivierter Caspase-3 nachgewiesen (Shin, et al., 2013). Die fehlende Zunahme in der vorliegenden Arbeit kann einerseits auf die fraktionierte Strahlendosis von jeweils 3 Gy zurückgeführt werden, welche möglicherweise zu gering ist, um die Signalkaskade von Caspase-3 zu aktivieren. Andererseits können auch die Zeitpunkte, zu denen die Probenentnahme erfolgte, für diese Diskrepanz beim Nachweis des Caspase-3-Spaltprodukts verantwortlich sein. Die Vergleichbarkeit der Daten wird zusätzlich durch die unterschiedlichen Detektionsmethoden erschwert; die in dieser Arbeit durchgeführte immunhistochemische Markierung von aktivierter Caspase-3 im Zungenepithel ist qualitativ im Gegensatz zur semiquantitativen Western Blot-Analyse in den genannten Publikationen.

Zur weiteren Beurteilung der Wirkung von Glutathion erfolgte der immunhistochemische Nachweis des antiapoptotischen Markers bcl-2 und des proapoptotischen Markers bax im Epithel der Zungenunterseite exemplarisch an ausgewählten Zeitpunkten bis Tag 11. Das Protein bcl-2 verhindert den Ausstrom von Cytochrom c aus der mitochondrialen Membran und fördert damit das Zellüberleben (Zimmermann, et al., 2001). In Lymphomzelllinien wurde eine Assoziation zwischen bcl-2-Expression und Resistenz gegenüber strahleninduzierter Apoptose nachgewiesen, welche unter anderem auf einen erhöhten intrazellulären Glutathiongehalt beruhen (Vlachaki und Meyn, 1998).

Bcl-2 wurde in unbestrahlten Zungen nur von basalen Keratinozyten exprimiert, der Markierungsindex betrug 0,18 %. Die Lokalisation der bcl-2 positiven Zellen ist in guter Übereinstimmung mit den Angaben in der Literatur (Jordan, et al., 1996; Piattelli, et al., 2002; Ribeiro, et al., 2005). Die in diesen Publikationen ermittelten Werte zum Markierungsindex von bcl-2 im unbestrahlten Epithel der Mundschleimhaut sind jedoch deutlich höher und variieren von ca. 20 % in der Ratte (Ribeiro, et al., 2005) bis zu durchschnittlich 33,5 % im Hamster (Derka, et al., 2006). Diese ebenfalls immunhistochemisch ermittelten Werte übersteigen den bcl-2 Markierungsindex der unbehandelten Kontrollen der vorliegenden Arbeit um ein Vielfaches. Die Unterschiede können durch mehrere Faktoren begründet sein, z.B. Art der Fixierung bei der Probenaufarbeitung, verwendeter Antikörper und besonders die unterschiedlichen Spezies.

Die fraktionierte Bestrahlung beeinflusste deutlich den Verlauf des bcl-2-Markierungsindex, mit Zunahme der Bestrahlungstage kam es zu einer Reduktion an bcl-2 positiven Zellen. Im Vergleich zeigten die nur bestrahlten Kontrollproben die stärkste Abnahme, die Behandlung mit Desipramin führte zu einer geringeren Abnahme des bcl-2 Markierungsindex an den Tagen 7 und 11. Der höhere bcl-2 Markierungsindex der mit Desipramin behandelten Proben war allerdings nicht mit einer vergleichbaren Reduktion der apoptotischen Zellen (aktivierte Caspase-3 Markierungsindex) an den jeweiligen Entnahmetagen verbunden. Die Ursachen für diese Diskrepanz sind unklar.

Das antiapoptotische Protein bax wurde in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen. Im Zungenepithel der Ratte betrug der bax Markierungsindex ca. 33 % (Ribeiro, et al., 2005); möglicherweise ist auch hier der Nachweis von verwendeten Antikörpern, Vorbehandlungen und der Spezies abhängig. Weder während der fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy noch bei der zusätzlichen Behandlung mit den Inhibitoren wurde immunhistochemisch eine Veränderung der Expression von bax beobachtet. In der Literatur finden sich *in vivo* Studien, welche beschreiben, dass das murine Zungenepithel nach Bestrahlung des Kopfes mit 22,5 Gy mit der Spaltung von Caspase-3 und einer Zunahme der Expression von bax reagiert (Talwar, et al., 2013). Die Unterschiede in den Expressionsmustern der an der Apoptose beteiligten Signalmoleküle sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den genetischen Hintergrund der untersuchten Mausstämme zurückzuführen. Dies wird durch eine Studie belegt, welche zeigt, dass der Stamm C57/6 gegenüber den Stämmen C3H/ Kam und C3H/ HJe eine höhere Apoptoserate der Zellen in den Krypten der Dünndarmschleimhaut sechs Stunden nach Ganzkörperbestrahlung mit 2,5 Gy aufweist (Weil, et al., 1996).

5.7.4 Immunhistochemische Untersuchungen des Gefäßendothels

Im Gefäßendothel der Submukosa konnten weder nSMase1 noch Ceramide immunhistochemisch nachgewiesen werden. Auch eine fraktionierte Bestrahlung führte zu keiner nachweisbaren Expression. Es ist demnach auszuschließen, dass ceramidvermittelte Apoptose im Gefäßendothel verantwortlich für die Entstehung der radiogenen *Mucositis enoralis* ist.

Für das Vorkommen von granulären Spaltprodukten der Caspase-3 im Endothel arterieller Gefäße der murinen Zunge (siehe 4.6.2.2) gibt es derzeit kaum vergleichbare Berichte in der Literatur. Es wird die Expression aktivierter Caspase-3 im Gefäßendothel der humanen Epidermis beschrieben, jedoch nicht diskutiert (Akasaka, et al., 2000). Da die Granula sowohl vor als auch nach Bestrahlung nachweisbar sind, handelt es sich möglicherweise um physiologische Bestandteile des arteriellen Endothels.

5.8 Bedeutung der ceramid-vermittelten Apoptose für die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Inhibition des Sphingomyelin - Signalweges durch Glutathion zu keiner Modulation der radiogenen *Mucositis enoralis* führt. Auch weitere Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe weisen keinen Einfluss der Inhibitoren Fumonisin B1 (Limpert, 2014) und Desipramin (Mey, Diss. med. dent., in Vorbereitung) auf die Strahlenreaktion der murinen Mundschleimhaut nach. Daraus kann geschlossen werden, dass die ceramidvermittelte Apoptose bei Einzeitbestrahlung der murinen Mundschleimhaut mit Dosen bis 18 Gy und fraktionierter Bestrahlung mit 5 x 3 Gy bzw. 10 x 3 Gy für die Entstehung einer oralen Mukositis von untergeordneter Relevanz ist. Bestätigt wurde diese Annahme auch durch immunhistochemische Untersuchungen. Es wurde gezeigt, dass die in der Germinativschicht exprimierte nSMase1 nach fraktionierter Bestrahlung keine immunhistochemisch nachweisbaren Ceramide synthetisiert. Die Quantifizierung aktivierter Caspase-3 positiver Zellen zeigte, dass Apoptosen nicht in einer für die Entstehung der oralen Mukositis relevanten Anzahl induziert wurden.

Im Gegensatz dazu wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass ionisierende Strahlung Apoptose in gastrointestinalen Schleimhäuten induziert, z.B. im Epithel des Dünndarms (Inagaki-Ohara, et al., 2002; Merritt, et al., 1997; Potten und Grant, 1998) oder auch der Mundhöhle (Sonis, 2007; Talwar, et al., 2013; Wu, et al., 2012). Dieser Widerspruch ist möglicherweise auf die deutlich höheren Strahlendosen und unterschiedliche genetische Hintergründe der verwendeten Tiermodelle zurückzuführen (siehe 5.7.3). Die unterschiedlichen Strahlenreaktionen von Mund- und Darmschleimhaut bezüglich der Apoptose lassen sich auch auf die verschiedenen Expressionsmuster der Gewebe zurückführen: das proapoptotische Protein bax wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Autorin im murinen Mundschleimhautepithel nicht nachgewiesen; das Epithel der Darmschleimhaut dagegen eignete sich aufgrund eines hohen Markierungsindex als Positivkontrolle (Daten nicht gezeigt).

6 Ausblick

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu klären, welche Bedeutung die ceramidvermittelte Apoptose für die Entstehung der radiogenen *Mucositis enoralis* hat. Die gewonnenen Daten widerlegen die Hypothese einer Relevanz der Apoptose für die Strahlenreaktion der murinen Mundschleimhaut. Ob dieses Ergebnis auf andere Gewebearten übertragbar ist, ist unklar. Die Daten deuten daraufhin, dass die Fähigkeit zur ceramidvermittelten Apoptose vom Vorhandensein des proapoptotischen Proteins Bax abhängig ist, welches jedoch im oralen Schleimhautepithel nicht exprimiert wird.

Die Ergebnisse der tierexperimentellen Arbeiten zeigten in zwei Protokollen der fraktionierten Bestrahlung über eine Woche eine geringe, aber signifikante Zunahme der Strahlentoleranz. Da nicht alle Versuchsarme diesen Trend zeigten, kann geschlossen werden, dass die ceramidvermittelte Apoptose kein zentraler Mechanismus der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut ist. Bestätigt wurde dies auch durch die Ergebnisse der Arbeiten mit verschiedenen Inhibitoren der Ceramidsynthese (Fumonisin B1, Desipramin) aus der eigenen Arbeitsgruppe. Es wäre aber zu prüfen, auf welchen Mechanismus der mukoprotektive Effekt Glutathions bei einer einwöchigen fraktionierten Bestrahlung beruht. Da die bisherigen histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen keinen Aufschluss darüber gaben, sind weiterführende Analysen nötig.

7 Zusammenfassung

Die frühe Strahlenreaktion der Mundschleimhaut ist eine regelmäßige und dosislimitierende Nebenwirkung der Strahlenbehandlung fortgeschrittener Kopf-Hals-Tumoren. Trotz einer Vielzahl von experimentellen und klinischen Ansätzen gibt es bis jetzt keine allgemein gültige Prophylaxe oder ein Behandlungskonzept. Die molekularen Mechanismen, die der Entstehung der radiogenen *Mucositis enoralis* zugrunde liegen, sind allerdings noch nicht geklärt. Die Beteiligung apoptotischer Prozesse an der Entstehung der radiogenen *Mucositis enoralis* wird derzeit kontrovers diskutiert. Das Signalmolekül Ceramid, welches bei Bestrahlung durch das Enzym neutrale Sphingomyelinase (nSMase) aus dem Membranbaustein Sphingomyelin freigesetzt wird, gilt als ein Initiator der Apoptose. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu prüfen, welchen Einfluss die Inhibition der Ceramidsynthese durch Glutathion auf die Ausprägung der radiogenen *Mucositis enoralis* hat. Ergänzt wurden die experimentellen Arbeiten durch die Auswertung histologischer Präparate, welche bei einer fraktionierten Bestrahlung ohne bzw. mit verschiedenen Inhibitoren der Ceramidsynthese (Glutathion, Fumonisin B1, Desipramin) behandelt wurden.

Alle Untersuchungen wurden am etablierten Tiermodell der Zungenunterseite der Maus (Stamm C3H/Neu) durchgeführt. Die Bestrahlung erfolgte als lokale Einzeitapplikation (Tag 0) oder als perkutane fraktionierte Bestrahlung mit 5 x 3 Gy/ Woche über eine Woche (Tag 0-4) oder zwei Wochen (Tag 0-4, 7-11), gefolgt von einer lokalen Testbestrahlung an Tag 7 bzw. Tag 14. Als klinisch relevanter Endpunkt diente die Ausbildung ulzerativer Läsionen der Schleimhaut. Zur Inhibition der nSMase1 wurde Glutathion (1 µmol/Tag, subkutan) nach verschiedenen Protokollen verabreicht. In Verbindung mit einer Einzeitbestrahlung wurde Glutathion von Tag -3 bis zur ersten Diagnose der Ulzera (-3/D) bzw. deren kompletten Heilung (-3/H) appliziert. Bei einwöchiger fraktionierter Bestrahlung erfolgte die Applikation von Tag -3 bis zum Tag der Testbestrahlung (-3/7) oder bis zur Diagnose (-3/D) bzw. bis zur Heilung (-3/H) der ulzerativen Läsionen. Die Protokolle für die fraktionierte Bestrahlung über zwei Wochen umfassten die Applikation während der ersten Bestrahlungswoche (-3/7), der zweiten Bestrahlungswoche (7/14), des gesamten Bestrahlungszeitraumes (-3/14) sowie bis zur Diagnose (-3/D) und bis zur Heilung (-3/H). In begleitenden histologischen Untersuchungen wurden die Zellzahlen im Zungenepithel bestimmt, sowie verschiedene Marker der Proliferation (Ki-67), der Apoptose (cleaved Caspase-3, Bcl-2, Bax) und des Sphingolipidmetabolismus (nSMase1, Ceramid) immunhistochemisch erfasst. Es wurden dafür sowohl histologische Präparate der eigenen experimentellen Arbeit (Glutathion), als auch Präparate aus der Arbeitsgruppe (Kontrollen, Fumonisin B1, Desipramin) ausgewertet. Die Behandlung mit Glutathion führte bei Einzeitbestrahlung in keinem der Protokolle zu einer signifikanten Veränderung der ED₅₀ im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung (Kontrolle: 13,0 ± 0,7 Gy; -3/D: 12,8 ± 0,7 Gy; -3/H: 12,3 ± 0,6 Gy). Bei der fraktionierten Bestrahlung

über eine Woche mit Glutathiongabe von Tag -3 bis zur Erstdiagnose (-3/D) bzw. Heilung (-3/H) der ulzerativen Läsionen wurde eine signifikante Verringerung der Ulkushäufigkeiten beobachtet; die Applikation bis Tag 7 (-3/7) führte dagegen zu keiner signifikanten Veränderung der Ulkushäufigkeit (Kontrolle: $11,1 \pm 0,1$ Gy; -3/D: $14,6 \pm 1,8$ Gy; -3/H: $13,1 \pm 0,6$ Gy; -3/7: $12,0 \pm 0,0$ Gy). Auch die Protokolle der zweiwöchigen fraktionierten Bestrahlungen zeigten keine signifikanten Unterschiede der Strahlentoleranz bei Behandlung mit Glutathion (Kontrolle $12,1 \pm 0,1$ Gy; -3/14: $12,4 \pm 0,7$ Gy; -3/7: $13,2 \pm 1,0$ Gy; -3/D: $14,1 \pm 0,7$ Gy; -3/H: $13,5 \pm 0,8$ Gy; 7/14: $13,7 \pm 0,6$ Gy).

Die histologischen Untersuchungen zeigten, dass die Applikation von Inhibitoren der Ceramidsynthese zu keiner systematischen Veränderung der epithelialen Zelldichte im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung führt. Das Minimum der Zellzahl der nur bestrahlten Proben betrug 68,6 % an Tag 5, vergleichbar mit dem Zellverlust der mit Glutathion, Desipramin und Fumonisin B1 behandelten Proben. Auf die Epitheldicke konnte ebenfalls kein systematischer Einfluss der getesteten Inhibitoren nachgewiesen werden.

Die immunhistochemische Detektion des Proliferationsmarkers Ki-67 zeigte, dass sowohl Glutathion als auch die anderen verwendeten Inhibitoren im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung keinen Einfluss auf die Zellproliferation haben. Der Anteil apoptotischer Zellen (Nachweis des Spaltprodukts der Caspase-3) blieb bei Inhibitor-Applikation in der ersten Woche der fraktionierten Bestrahlung relativ konstant auf dem Niveau der alleinigen Bestrahlung, in der zweiten Woche stieg er um den Faktor 10 an. In guter Übereinstimmung zu dem geringen Apoptoseindex der Mundschleimhaut nach Bestrahlung wurde das proapoptotischen Protein Bax nicht nachgewiesen.

Das Enzym nSMase1 wurde in den Zellen im unteren Teil des *Stratum spinosum* des Schleimhautepithels nachgewiesen; eine Zunahme von Ceramid während der alleinigen Bestrahlung konnte immunhistochemisch nicht beobachtet werden. Die Behandlung mit den Inhibitoren hatte keinen nachweisbaren Einfluss auf das Vorkommen von Ceramiden im Zungenepithel.

Die Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen erbrachten keine Hinweise auf die Beteiligung von Ceramiden bzw. apoptotischer Prozesse an der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut. Wäre dies die Ursache, so müsste auch in allen Protokollen – insbesondere der Einzeitbestrahlung – eine Erhöhung der Strahlentoleranz durch die Applikation von Glutathion beobachtbar gewesen sein. Der mukoprotektive Effekt von Glutathion in den Versuchssarmen der fraktionierten Bestrahlung über eine Woche ist deshalb möglicherweise auf eine Stimulation der Repopulierung zurückzuführen. Für eine vollständige Klärung der zugrunde liegenden Mechanismen bedarf es weiterer präklinischer Studien.

8 Summary

The early radiation response of the oral mucosa is a frequent and dose-limiting side effect of the radiotherapy of advanced head-and-neck tumours. So far, no general concept for prophylaxis or managements has been established, despite a variety of experimental and clinical approaches. The molecular mechanisms underlying the radiation-induced oral mucositis have not yet been characterised. Currently, the contribution of apoptotic processes to the manifestation of oral mucositis is discussed controversially. The signalling molecule ceramide, which is released from the membrane element sphingomyelin during irradiation by neutral sphingomyelinase (nSMase), is considered as an initiator of apoptotic processes. The aim of the present study was to investigate the effect of an inhibition of ceramide synthesis by glutathione on the manifestation of radiation-induced oral mucositis. The experimental studies are supplemented by the analyses of histological samples during fractionated irradiation without or with inhibition of the ceramide synthesis via glutathione, fumonisins B1 and desipramine.

All investigations were performed on the established animal model of the lower tongue surface in mice (C3H/Neu strain). Irradiation comprised either local single doses (day 0) or percutaneous fractionated protocols with 5 x 3 Gy/week over one week (days 0-4) or two weeks (days 0-4, 7-11), followed by a local test irradiation on days 7 or 14, respectively. The manifestation of ulcerative lesions of the mucosa was analysed as clinically relevant endpoint. For inhibition of nSMase1, glutathione (1 µmol/day, subcutaneously) was used in various protocols. In combination with single dose irradiation, glutathione was administered from day -3 until first diagnosis (-3/D) or complete healing (-3/H) of the ulcerations. During one week of fractionation, the drug was applied from day -3 until test irradiation (-3/7) or until ulcer diagnosis (-3/D) or healing (-3/H). The different protocols for two weeks of fractionated irradiation included the administration of glutathione in the first or second treatment week alone (-3/7 or 7/14), in both weeks (-3/14) as well as a continuation until ulcer diagnosis (-3/D) or healing (-3/H). For the histological studies, samples of the authors own project (glutathione) as well as samples of other projects of the research group (irradiation alone, fumonisins B1, desipramine) were analysed. The epithelium of the lower tongue was examined regarding cell numbers and the expression of markers of proliferation (Ki-67), apoptosis (caspase-3, bcl-2, bax) and sphingolipid metabolism (nSMase1, ceramide).

The administration of glutathione combined with single dose irradiation did not result in a significant change in ED50 values in any of the protocols compared to irradiation alone (ED50 control: 13,0 ± 0,7 Gy; -3/D: 12,8 ± 0,7 Gy; -3/H: 12,3 ± 0,6 Gy). Under fractionated irradiation over one week, glutathione application from day -3 to ulcer diagnosis (-3/D) or healing (-3/H) resulted in a significant reduction of ulcer frequency; in contrast, the administration from day -3 to 7 (-3/7) did not change ulcer incidence (ED50 control:

11,1 ± 0,1 Gy; -3/D: 14,6 ± 1,8 Gy; -3/H: 13,1 ± 0,6 Gy; -3/7: 12,0 ± 0,0 Gy). Likewise, no significant differences were observed during two weeks of fractionated irradiation (ED50 control 12,1 ± 0,1 Gy; -3/14: 12,4 ± 0,7 Gy; -3/7: 13,2 ± 1,0 Gy; -3/D: 14,1 ± 0,7 Gy; -3/H: 13,5 ± 0,8 Gy; 7/14: 13,7 ± 0,6 Gy).

The histological studies revealed that the application of inhibitors of the ceramide synthesis did not result in a systematic variation in cell numbers compared to radiotherapy alone. Cell numbers decreased to a minimum of 69 % (of pre-treatment control values) on day 5 independent of the administration of glutathione, fumonisins B1 or desipramine. Accordingly, no systematic effect on epithelial thickness was found.

Immunohistochemical detection of the proliferation marker Ki-67 demonstrated that neither glutathione nor the other inhibitors significantly influence cell proliferation. The frequency of apoptotic cells (detection of cleaved caspase 3) remained constant in the first week of fractionated irradiation. There was no difference between radiotherapy alone and combined administration of the inhibitors. In the second week, radiation treatment led to a tenfold increase of apoptotic cells. In accordance with the low apoptotic index, the pro-apoptotic protein bax was not detectable.

The enzyme nSMase1 was found in the lower parts of the spinous layer of the epithelium. No increase in ceramide levels was observed during irradiation alone or combined treatment with inhibitors.

The results of the histological and immunohistochemical investigations did not indicate that ceramides or apoptotic processes alter the radiation response of the oral mucosa. If there was a correlation, all functional protocols - particularly in combination with single dose irradiation - should have shown an increase in radiation tolerance under glutathione treatment. The mucoprotective effect of glutathione in the experimental arms with fractionated irradiation over one week may be attributed to a stimulation of repopulation processes. A clarification of the underlying mechanisms requires further preclinical studies.

9 Literaturverzeichnis

- Akasaka Y, Ishikawa Y, Ono I, Fujita K, Masuda T, Asuwa N, Inuzuka K, Kiguchi H, Ishii T. 2000. Enhanced expression of caspase-3 in hypertrophic scars and keloid: induction of caspase-3 and apoptosis in keloid fibroblasts in vitro. *Lab Invest* 80(3):345-57.
- Albouz S, Hauw J, Berwald-Netter Y, Boutry J, Bourdon R, Baumann N. 1981. Tricyclic antidepressants induce sphingomyelinase deficiency in fibroblast and neuroblastoma cell cultures. *Biomedicine/[publiee pour l'AAICIG]* 35(7-8):218-220.
- Alphonse G, Aloy MT, Broquet P, Gerard JP, Louisot P, Rousson R, Rodriguez-Lafrasse C. 2002. Ceramide induces activation of the mitochondrial/caspases pathway in Jurkat and SCC61 cells sensitive to gamma-radiation but activation of this sequence is defective in radioresistant SQ20B cells. *Int J Radiat Biol* 78(9):821-35.
- Alphonse G, Bionda C, Aloy M-T, Ardail D, Rousson R, Rodriguez-Lafrasse C. 2004. Overcoming resistance to γ -rays in squamous carcinoma cells by poly-drug elevation of ceramide levels. *Oncogene* 23(15):2703-2715.
- Alvarez E, Fey EG, Valax P, Yim Z, Peterson JD, Mesri M, Jeffers M, Dindinger M, Twomlow N, Ghatpande A. 2003. Preclinical characterization of CG53135 (FGF-20) in radiation and concomitant chemotherapy/radiation-induced oral mucositis. *Clinical cancer research* 9(9):3454-3461.
- Ang KK, Peters LJ, Weber RS, Maor MH, Morrison WH, Wendt CD, Brown BW. 1990. Concomitant boost radiotherapy schedules in the treatment of carcinoma of the oropharynx and nasopharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19(6):1339-45.
- Ara G, Watkins BA, Zhong H, Hawthorne TR, Karkaria CE, Sonis ST, Larochele WJ. 2008. Velafermin (rhFGF-20) reduces the severity and duration of hamster cheek pouch mucositis induced by fractionated radiation. *International journal of radiation biology* 84(5):401-412.
- Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. 2008. Head and neck cancer. *The Lancet* 371(9625):1695-1709.
- Arimochi H, Morita K. 2006. Characterization of cytotoxic actions of tricyclic antidepressants on human HT29 colon carcinoma cells. *European journal of pharmacology* 541(1):17-23.
- Armstrong JA, McCaffrey R. 2006. The effects of mucositis on quality of life in patients with head and neck cancer. *Clinical journal of oncology nursing* 10(1):53.
- ASTRO. 2014. Fast Facts About Radiation Therapy. URL: <https://www.astro.org/News-and-Media/Media-Resources/FAQs/Fast-Facts-About-Radiation-Therapy/Index.aspx> [Aufruf am 07.01.2016].
- Aureli M, Murdica V, Loberto N, Samarani M, Prinetti A, Bassi R, Sonnino S. 2014. Exploring the link between ceramide and ionizing radiation. *Glycoconj J* 31(6-7):449-59.
- Balendiran GK, Dabur R, Fraser D. 2004. The role of glutathione in cancer. *Cell biochemistry and function* 22(6):343-352.
- Barasch A, Elad S, Altman A, Damato K, Epstein J. 2006. Antimicrobials, mucosal coating agents, anesthetics, analgesics, and nutritional supplements for alimentary tract mucositis. *Supportive Care in Cancer* 14(6):528-532.
- Barasch A, Epstein JB. 2011. Management of cancer therapy-induced oral mucositis. *Dermatologic therapy* 24(4):424-431.
- Barasch A, Peterson DE. 2003. Risk factors for ulcerative oral mucositis in cancer patients: unanswered questions. *Oral oncology* 39(2):91-100.

- Barnes L. 2005. Pathology and genetics of head and neck tumours: IARC.
- Barth J. 2010. Zytostatische Chemotherapie. Die Onkologie: Springer. p 401-436.
- Baumann M, Gregoire V. 2009. Modified fractionation. In: Joiner M, Kogel Avd, editors. Basic clinical radiobiology. Hodder Arnold, London. London: Hodder Arnold. p 135-148.
- Bensadoun R-J, Magné N, Marcy P-Y, Demard F. 2001. Chemotherapy-and radiotherapy-induced mucositis in head and neck cancer patients: new trends in pathophysiology, prevention and treatment. European archives of oto-rhino-laryngology 258(9):481-487.
- Bensadoun R-J, Nair RG. 2012. Low-level laser therapy in the prevention and treatment of cancer therapy-induced mucositis: 2012 state of the art based on literature review and meta-analysis. Current opinion in oncology 24(4):363-370.
- Bensadoun R-J, Riesenbeck D, Lockhart PB, Elting LS, Spijkervet FK, Brennan MT. 2010. A systematic review of trismus induced by cancer therapies in head and neck cancer patients. Supportive Care in Cancer 18(8):1033-1038.
- Bentzen SM, Ruifrok AC, Thames HD. 1996. Repair capacity and kinetics for human mucosa and epithelial tumors in the head and neck: clinical data on the effect of changing the time interval between multiple fractions per day in radiotherapy. Radiotherapy and oncology 38(2):89-101.
- Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Kurth B-M, Wolf U. 2010. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland.
- Betiol J, Villa LL, Sichero L. 2013. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. Braz J Med Biol Res 46(3):217-26.
- Bier H, Bergler W, Mende S, Ganzer U. 1988. Glutathione content and γ -glutamyltranspeptidase activity in squamous cell head and neck cancer xenografts. Archives of oto-rhino-laryngology 245(3):166-169.
- Bjarnason GA, Jordan RC, Sothorn RB. 1999. Circadian variation in the expression of cell-cycle proteins in human oral epithelium. The American journal of pathology 154(2):613-622.
- Bjoridal JM, Bensadoun R-J, Tunè J, Frigo L, Gjerde K, Lopes-Martins RA. 2011. A systematic review with meta-analysis of the effect of low-level laser therapy (LLLT) in cancer therapy-induced oral mucositis. Supportive Care in Cancer 19(8):1069-1077.
- Bohuslavizki KH, Klutmann S, Bleckmann C, Brenner W, Lassmann S, Mester J, Henze E, Clausen M. 1999. Salivary gland protection by amifostine in high-dose radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. Strahlentherapie und Onkologie 175(2):57-61.
- Bootz F, Howaldt H, Mergenthaler H, Wendt T. 2008. Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes. Kurzgefasste interdisziplinäre Leitlinien:17-18.
- Borrelli A, Schiattarella A, Mancini R, Morrica B, Cerciello V, Mormile M, d'Alesio V, Bottalico L, Morelli F, D'Armiento M. 2009. A recombinant MnSOD is radioprotective for normal cells and radiosensitizing for tumor cells. Free Radical Biology and Medicine 46(1):110-116.
- Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z, Kolesnick R. 1995. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. Cell 82(3):405-414.
- Bourhis J, Overgaard J, Audry H, Ang KK, Saunders M, Bernier J, Horiot J-C, Le Maître A, Pajak TF, Poulsen MG. 2006. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. The Lancet 368(9538):843-854.

- Brizel DM, Murphy BA, Rosenthal DI, Pandya KJ, Glück S, Brizel HE, Meredith RF, Berger D, Chen M-G, Mendenhall W. 2008. Phase II study of palifermin and concurrent chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of clinical oncology* 26(15):2489-2496.
- Brown M. 2008. What causes the radiation gastrointestinal syndrome?: Overview. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 70(3):799-803.
- Bruno AP, Laurent G, Averbeck D, Demur C, Bonnet J, Bettaïeb A, Levade T, Jaffrézou J-P. 1998. Lack of ceramide generation in TF-1 human myeloid leukemic cells resistant to ionizing radiation. *Cell Death & Differentiation* 5(2).
- Budach V, Stuschke M, Budach W, Baumann M, Geismar D, Grabenbauer G, Lammert I, Jahnke K, Stueben G, Herrmann T and others. 2005. Hyperfractionated accelerated chemoradiation with concurrent fluorouracil-mitomycin is more effective than dose-escalated hyperfractionated accelerated radiation therapy alone in locally advanced head and neck cancer: final results of the radiotherapy cooperative clinical trials group of the German Cancer Society 95-06 Prospective Randomized Trial. *J Clin Oncol* 23(6):1125-35.
- Budach W, Hehr T, Budach V, Belka C, Dietz K. 2006. A meta-analysis of hyperfractionated and accelerated radiotherapy and combined chemotherapy and radiotherapy regimens in unresected locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *BMC cancer* 6(1):28.
- Buentzel J, Micke O, Adamietz IA, Monnier A, Glatzel M, de Vries A. 2006. Intravenous amifostine during chemoradiotherapy for head-and-neck cancer: a randomized placebo-controlled phase III study. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 64(3):684-691.
- Bump EA, Brown JM. 1990. Role of glutathione in the radiation response of mammalian cells invitro and in vivo. *Pharmacology & therapeutics* 47(1):117-136.
- Burholt D. Proliferative response of the murine esophageal epithelium to radiation: Modification by food consumption patterns; 1985.
- Burholt D. 1986. Oesophageal epithelial cell proliferation and food consumption patterns following irradiation. *The British journal of cancer. Supplement* 7:7.
- B  tof R, Baumann M. 2013. Time in radiation oncology–Keep it short! *Radiotherapy and oncology* 106(3):271-275.
- Calais G, Alfonsi M, Bardet E, Sire C, Germain T, Bergerot P, Rhein B, Tortochaux J, Oudinot P, Bertrand P. 1999. Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 91(24):2081-6.
- Caluwaerts S, Vandenbroucke K, Steidler L, Neirynck S, Vanhoenacker P, Corveleyn S, Watkins B, Sonis S, Coulie B, Rottiers P. 2010. AG013, a mouth rinse formulation of *Lactococcus lactis* secreting human Trefoil Factor 1, provides a safe and efficacious therapeutic tool for treating oral mucositis. *Oral oncology* 46(7):564-570.
- Carroll J, Barasch A, JB E, Nair R, Raber-Durlacher J, RJ B. 2015. Low level laser treatment for the management of oral mucositis: Mechanisms of action, irradiation parameters and dose.

- Cassatt DR, Fazenbaker CA, Bachy CM, Kifle G, McCarthy MP. 2005. Amifostine (ETHYOL) protects rats from mucositis resulting from fractionated or hyperfractionated radiation exposure. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 61(3):901-907.
- Cassatt DR, Fazenbaker CA, Kifle G, Bachy CM. 2003. Subcutaneous administration of amifostine (ethyol) is equivalent to intravenous administration in a rat mucositis model. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 57(3):794-802.
- Cawley MM, Benson LM. 2005. Current trends in managing oral mucositis. *Clinical journal of oncology nursing* 9(5).
- Chang DS, Lasley FD, Das IJ, Mendonca MS, Dynlacht JR. 2014. *Cell and Tissue Kinetics. Basic Radiotherapy Physics and Biology*: Springer. p 249-258.
- Chapman W, Cronkite E. 1950. Further studies of the beneficial effect of glutathione on x-irradiated mice. *Experimental Biology and Medicine* 75(2):318-322.
- Chatterjee A. 2013. Reduced glutathione: a radioprotector or a modulator of DNA-repair activity? *Nutrients* 5(2):525-542.
- Chipuk JE, McStay GP, Bharti A, Kuwana T, Clarke CJ, Siskind LJ, Obeid LM, Green DR. 2012. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell* 148(5):988-1000.
- Chmura SJ, Mauceri HJ, Advani S, Heimann R, Beckett MA, Nodzenski E, Quintans J, Kufe DW, Weichselbaum RR. 1997a. Decreasing the apoptotic threshold of tumor cells through protein kinase C inhibition and sphingomyelinase activation increases tumor killing by ionizing radiation. *Cancer Res* 57(19):4340-7.
- Chmura SJ, Nodzenski E, Beckett MA, Kufe DW, Quintans J, Weichselbaum RR. 1997b. Loss of ceramide production confers resistance to radiation-induced apoptosis. *Cancer Res* 57(7):1270-5.
- Clarke CJ, Wu BX, Hannun YA. 2011. The neutral sphingomyelinase family: identifying biochemical connections. *Advances in enzyme regulation* 51(1):51.
- Coderre JA. 2008. In reply to Drs. Fuks and Kolesnick; Drs. Gudkov and Gleiberman; and Hendry et al. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 70(3):803-803.
- Coderre JA, Schuller BW, Rogers AB. 2008. In Reply to Drs. Fuks and Kolesnick; Drs. Gudkov and Gleiberman; and Hendry et al. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 70(3):802-803.
- Colombini M. 2016. Ceramide channels and mitochondrial outer membrane permeability. *Journal of bioenergetics and biomembranes*:1-8.
- Coper H, Helmchen H. 1992. *Psychopharmaka; Pharmakotherapie von Psychosen und psychoreaktiven Störungen. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. BI Wissenschaftsverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich 6:281-303.
- Corre I, Guillonneau M, Paris F. 2013. Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity. *International journal of molecular sciences* 14(11):22678-22696.
- Curado MP, Hashibe M. 2009. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Current opinion in oncology* 21(3):194-200.

- Cuzzocrea S, Di Paola R, Genovese T, Mazzon E, Esposito E, Crisafulli C, Bramanti P, Salvemini D. 2008. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of fumonisin B1, an inhibitor of ceramide synthase, in a rodent model of splanchnic ischemia and reperfusion injury. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 327(1):45-57.
- De Maria D, Falchi A, Venturino P. 1992. Adjuvant radiotherapy of the pelvis with or without reduced glutathione: a randomized trial in patients operated on for endometrial cancer. *Tumori* 78(6):374-376.
- DEGRO. 2015. Supportive Maßnahmen in der Radioonkologie; Deutsche Gesellschaft für Radioonkologie (DEGRO) URL: <http://www.degro.org/dav/html/leitlinien/LLSupportivtherapie.pdf>; [Aufruf am 12.01.2016].
- Delanian S, Lefaix J-L. 2004. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiotherapy and oncology* 73(2):119-131.
- Derka S, Vairaktaris E, Papakosta V, Vassiliou S, Acil Y, Vylliotis A, Spyridonidou S, Lazaris AC, Mourouzis C, Kokkori A and others. 2006. Cell proliferation and apoptosis culminate in early stages of oral oncogenesis. *Oral Oncol* 42(5):540-50.
- Dewson G, Kratina T, Sim HW, Puthalakath H, Adams JM, Colman PM, Kluck RM. 2008. To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3: groove interactions. *Molecular cell* 30(3):369-380.
- Di Marzio L, Cinque B, De Simone C, Cifone MG. 1999. Effect of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* on ceramide levels in human keratinocytes in vitro and stratum corneum in vivo. *J Invest Dermatol* 113(1):98-106.
- Dijkstra P, Kalk W, Roodenburg J. 2004. Trismus in head and neck oncology: a systematic review. *Oral oncology* 40(9):879-889.
- Dimanche-Boitrel M-T, Meurette O, Rebillard A, Lacour S. 2005. Role of early plasma membrane events in chemotherapy-induced cell death. *Drug Resistance Updates* 8(1):5-14.
- Dinesh AG, Suresh PS, Thirunavukkarasu C, Weiergräber OH, Kumar MS. 2011. Molecular modeling of human neutral sphingomyelinase provides insight into its molecular interactions. *Bioinformation* 7(1):21.
- Dische S. 1988. A system for quantifying radiation morbidity, fourth draft. Nicht veröffentlicht, als Manuskript verteilt.
- Dische S, Saunders M, Barrett A, Harvey A, Gibson D, Parmar M. 1997. A randomised multicentre trial of CHART versus conventional radiotherapy in head and neck cancer. *Radiotherapy and oncology* 44(2):123-136.
- Dische S, Saunders MI. 1990. The rationale for continuous, hyperfractionated, accelerated radiotherapy (CHART). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19(5):1317-20.
- DKG. 2012. "Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms". Leitlinienprogramm Onkologie der AWMW, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V.; URL: http://leitlinienprogramm-onkologie.de/uploads/tx_sbdownloader/S3-Mundhoehlenkarzinom-OL-Langversion_.pdf; [Aufruf am 12.01.2016]
- Dörr W. 1987. Untersuchungen zur Strahlenreaktion des unbehandelten und stimulierten Zungenepithels der Maus, Diss. med. vet. Ludwig-Maximilian-Universität München.
- Dörr W. 1994. Repopulation in mouse oral mucosa: treatment splits. *Radiother Oncol* 33(2):139-47.

- Dörr W. 1997a. Strahlenbiologische Parameter der radiogenen Mucositis enoralis, Habilitationsschrift: Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden.
- Dörr W. 1997b. Three A's of repopulation during fractionated irradiation of squamous epithelia: Asymmetry loss, Acceleration of stem-cell divisions and Abortive divisions. *Int J Radiat Biol* 72(6):635-43.
- Dörr W. 2003. Modulation of repopulation processes in oral mucosa: experimental results. *Int J Radiat Biol* 79(7):531-7.
- Dörr W. 2006. Strahlenpathologie. In: Wannenmacher MD, J.; Wenz, F., editor. *Strahlentherapie*. Berlin Heidelberg New York: Springer. p 81-91.
- Dörr W. 2009a. Biological response modifiers: normal tissues. In: Joiner MvdK, A., editor. *Basic clinical radiobiology*. London: Hodder Arnold. p 301-315.
- Dörr W. 2009b. Pathogenesis of normal-tissue side-effects. In: Joiner MvdK, A., editor. *Basic Clinical Radiobiology*. London: Hodder Arnold. p 169-190.
- Dörr W. 2009c. Time factors in normal tissue responses to irradiation. In: Joiner MvdK, A., editor. *Basic Clinical Radiobiology*. London: Hodder Arnold. p 149-157.
- Dörr W. 2010. Strahlenwirkung am Normalgewebe. *Nuklearmedizin Supplement* 2010 49:53-58.
- Dörr W, Arui J, Beisker W, Schultz-Hector S. 1994a. Cell kinetic studies in mouse tongue mucosa by autoradiographic, immunohistochemical and flow cytometric techniques. *Cell Prolif* 27(6):321-32.
- Dörr W, Baumann M, Herrmann T. 1996a. [Nomenclature of modified fractionation protocols in radiotherapy]. *Strahlenther Onkol* 172(7):353-5.
- Dörr W, Breitner A, Kummermehr J. 1993. Capacity and kinetics of SLD repair in mouse tongue epithelium. *Radiother Oncol* 27(1):36-45.
- Dörr W, Dölling-Jochem I, Baumann M, Herrmann T. 1997. [The therapeutic management of radiogenic oral mucositis]. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft...[et al]* 173(4):183-192.
- Dörr W, Emmendorfer H, Haide E, Kummermehr J. 1994b. Proliferation equivalent of 'accelerated repopulation' in mouse oral mucosa. *Int J Radiat Biol* 66(2):157-67.
- Dörr W, Emmendorfer H, Weber-Frisch M. 1996b. Tissue kinetics in mouse tongue mucosa during daily fractionated radiotherapy. *Cell Prolif* 29(9):495-504.
- Dörr W, Groetz K, Hartmann J, Riesenbeck D. 2007. Orale Mukositis. *Der Onkologe* 13(2):150-157.
- Dörr W, Hamilton CS, Boyd T, Reed B, Denham JW. 2002a. Radiation-induced changes in cellularity and proliferation in human oral mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52(4):911-7.
- Dörr W, Hartmann J, Riesenbeck D, Grötz K. 2009. Mundschleimhaut. *Supportivtherapie in der Onkologie*. Urban & Vogel, München:72-85.
- Dörr W, Hendry JH. 2001. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* 61(3):223-31.
- Dörr W, Herrmann T. 2003. Akute Strahlenveränderungen der Gewebe. *Radioonkologie* 1:244-250.
- Dörr W, Herrmann T. 2009. Frühe Strahlenveränderungen der Gewebe. In: Bamberg MM, M.; Sack, H., editor. *Radioonkologie Band 1: Grundlagen*. Gerning, München: Zuckschwerdt-Verlag. p 317-325.

- Dörr W, Herrmann T, Reitemeyer B, Riesenbeck D, Grötz KA. 2008. Folgen der Strahlentherapie in der Mundhöhle. Zahnmedizin up2date 2(06):543-569.
- Dörr W, Herrmann T, Riesenbeck D. 2005. Prävention und Therapie von Nebenwirkungen in der Radioonkologie: UNI-MED-Verlag.
- Dörr W, Herskind C. 2012. Strahlenbiologie der Normalgewebe. Strahlentherapie und Onkologie 188(3):295-298.
- Dörr W, Jacubek A, Kummermehr J, Herrmann T, Dölling-Jochem I, Eckelt U. 1995. Effects of stimulated repopulation on oral mucositis during conventional radiotherapy. Radiotherapy and oncology 37(2):100-107.
- Dörr W, Kummermehr J. 1990. Accelerated repopulation of mouse tongue epithelium during fractionated irradiations or following single doses. Radiother Oncol 17(3):249-59.
- Dörr W, Kummermehr J. 1991. Proliferation kinetics of mouse tongue epithelium under normal conditions and following single dose irradiation. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 60(5):287-94.
- Dörr W, Kummermehr J. 1992. Increased radiation tolerance of mouse tongue epithelium after local conditioning. Int J Radiat Biol 61(3):369-79.
- Dörr W, Noack R, Spekl K, Farrell CL. 2001. Modification of oral mucositis by keratinocyte growth factor: single radiation exposure. Int J Radiat Biol 77(3):341-7.
- Dörr W, Riesenbeck D. 2000. Mundhöhle. Nebenwirkungen in der Radioonkologie: Klinisches Kompendium. Urban & Vogel, München. p 130-142.
- Dörr W, Spekl K, Farrell CL. 2002b. Amelioration of acute oral mucositis by keratinocyte growth factor: fractionated irradiation. Int J Radiat Oncol Biol Phys 54(1):245-51.
- Dörr W, Spekl K, Farrell CL. 2002c. The effect of keratinocyte growth factor on healing of manifest radiation ulcers in mouse tongue epithelium. Cell Prolif 35 Suppl 1:86-92.
- Dörr W, Spekl K, Martin M. 2002d. Radiation-induced oral mucositis in mice: strain differences. Cell Prolif 35 Suppl 1:60-7.
- Dörr W, Van der Kogel A. 2009. The volume effect in radiotherapy. In: Joiner MVdK, A, editor. Basic Clinical Radiotherapy. London: Hodder Arnold. p 191-206.
- Dörr W, Weber-Frisch M. 1995a. Effect of changing weekly dose on accelerated repopulation during fractionated irradiation of mouse tongue mucosa. Int J Radiat Biol 67(5):577-85.
- Dörr W, Weber-Frisch M. 1995b. Repopulation response of mouse oral mucosa during unconventional radiotherapy protocols. Radiother Oncol 37(3):230-6.
- Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH. 2000. Nebenwirkungen in der Radioonkologie: klinisches Kompendium: Urban und Vogel.
- Dörr W, Herrmann, T.; Reitemeyer, B.; Riesenbeck, D.; Grötz, K.A. 2008. Folgen der Strahlentherapie in der Mundhöhle. Zahnmedizin up2date 6:543-569.
- Duan R-D. 2006. Alkaline sphingomyelinase: an old enzyme with novel implications. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids 1761(3):281-291.
- Eberle JC, Grötz KA. 2013. Zahnärztliche Betreuung von Tumorpatienten. Zahnmedizin up2date 7(04):357-378.
- Elias PM, Menon GK, Grayson S, Brown BE. 1988. Membrane structural alterations in murine stratum corneum: relationship to the localization of polar lipids and phospholipases. J Invest Dermatol 91(1):3-10.

- Elkind M, Sutton H. 1960. Radiation response of mammalian cells grown in culture: I. Repair of X-ray damage in surviving Chinese hamster cells. *Radiation research* 13(4):556-593.
- Elting LS, Cooksley CD, Chambers MS, Garden AS. 2007. Risk, outcomes, and costs of radiation-induced oral mucositis among patients with head-and-neck malignancies. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 68(4):1110-1120.
- Elting LS, Lu C, Escalante CP, Giordano SH, Trent JC, Cooksley C, Avritscher EB, Shih YC, Ensor J, Bekele BN and others. 2008. Outcomes and cost of outpatient or inpatient management of 712 patients with febrile neutropenia. *J Clin Oncol* 26(4):606-11.
- Epstein I. 2002. Benzydamin HCL for Prophylaxis of radiation-induced oral mucositis. *Cancer* 22:5492-5505.
- Epstein JB, Silverman S, Paggiarino DA, Crockett S, Schubert MM, Senzer NN, Lockhart PB, Gallagher MJ, Peterson DE, Leveque FG. 2001. Benzydamine HCl for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis. *Cancer* 92(4):875-885.
- Epstein JB, Stevenson-Moore P, Jackson S, Mohamed JH, Spinelli JJ. 1989. Prevention of oral mucositis in radiation therapy: a controlled study with benzydamine hydrochloride rinse. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 16(6):1571-1575.
- Estrela JM, Ortega A, Obrador E. 2006. Glutathione in cancer biology and therapy. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 43(2):143-181.
- Fehrmann A. 2010. Interaktion einer Blockade des Rezeptors für den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) mit der Gabe von Keratinozyten-Wachstumsfaktor (KGF) bei der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut–tierexperimentelle Untersuchungen an Mäusen, Diss. med. vet.: Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.
- Ferreira JAG, Olasolo JJ, Azinovic I, Jeremic B. 2015. Effect of radiotherapy delay in overall treatment time on local control and survival in head and neck cancer: Review of the literature. *Reports of Practical Oncology & Radiotherapy* 20(5):328-339.
- Feyer P. 2006. Leitlinien in der Radioonkologie; Supportive Maßnahmen DEGRO; URL: <http://www.degro.org/dav/html/download/pdf/LeitlinieSupportiveMassnahmen.pdf>; [Aufruf am 12.01.2016].
- Finch PW, Rubin JS, Miki T, Ron D, Aaronson SA. 1989. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science* 245(4919):752-755.
- Freinkel RK, Woodley DT. 2001. *The biology of the skin*: CRC Press.
- Frerich B. 2013. Infizierte Osteoradionekrose (IORN). *Der MKG-Chirurg* 6(2):107-112.
- Fritz P, Roth S, Pötter R, Hensley F, Muskalla K, Weber K-J, Wannenmacher M, Macha H-N, Dimopoulos J. 2013. Grundlagen und Technik der Brachytherapie. *Strahlentherapie*: Springer. p 125-175.
- Fu KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, Phillips TL, Garden AS, Ridge JA, Cooper JS, Ang KK. 2000. A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48(1):7-16.
- Fuks Z, Alfieri A, Haimovitz-Friedman A, Seddon A, Cordon-Cardo C. 1994. Intravenous basic fibroblast growth factor protects the lung but not mediastinal organs against radiation-induced apoptosis in vivo. *The cancer journal from Scientific American* 1(1):62-72.

- Galbiatti ALS, Padovani-Junior JA, Maníglia JV, Rodrigues CDS, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. 2013. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Brazilian journal of otorhinolaryngology* 79(2):239-247.
- Ganesan V, Perera MN, Colombini D, Datskovskiy D, Chadha K, Colombini M. 2010. Ceramide and activated Bax act synergistically to permeabilize the mitochondrial outer membrane. *Apoptosis* 15(5):553-562.
- García-Ruiz C, Colell A, Marí M, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernández-Checa JC. 2003. Defective TNF- α -mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *The Journal of clinical investigation* 111(2):197-208.
- Gazzaniga P, Gradilone A, Gandini IS. 1996. Bcl-2/bax mRNA expression ratio as prognostic factor in low-grade urinary bladder cancer. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 69:100-104.
- Gehrisch A, Dörr W. 2007. Effects of systemic or topical administration of sodium selenite on early radiation effects in mouse oral mucosa. *Strahlenther Onkol* 183(1):36-42.
- GEKID. 2012. Krebs in Deutschland 2007-2008. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
- Gencer D. 2013. Kombination von Zytostatika mit Strahlentherapie: Radiochemotherapie. *Strahlentherapie: Springer*. p 249-269.
- George NM, Evans JJ, Luo X. 2007. A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes & development* 21(15):1937-1948.
- Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133(4):1710-5.
- Goepp R, Fitch F. 1962. Pathological study of oral radiation death in mice. *Radiation research* 16(6):833-845.
- Gogolok J, Schuemer R, Ströhlein G. 1992. Datenverarbeitung und statistische Auswertung mit SAS. 1. Einführung in das Programmsystem, Datenmanagement und Auswertung: SAS-Version 6 (Großrechner: Version 6.06; PC Versionen 6.03 und 6.04): G. Fischer.
- Grassmé H, Cremesti A, Kolesnick R, Gulbins E. 2003. Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* 22(35):5457-5470.
- Greenberger JS, Epperly MW. 2007. Antioxidant gene therapeutic approaches to normal tissue radioprotection and tumor radiosensitization. *In vivo* 21(2):141-146.
- Greenspan D, Daniels TE. 1987. Effectiveness of pilocarpine in postradiation xerostomia. *Cancer* 59(6):1123-1125.
- Grötz K. 2003. Dental care for patients with antineoplastic radiotherapy of the head and neck. *Strahlentherapie und Onkologie: Organ der Deutschen Röntgengesellschaft...[et al]* 179(4):275.
- Grötz KA, Riesenbeck D, Brahm R, Seegenschmiedt MH, al-Nawas B, Dörr W, Kutzner J, Willich N, Thelen M, Wagner W. 2001. [Chronic radiation effects on dental hard tissue (radiation caries). Classification and therapeutic strategies]. *Strahlenther Onkol* 177(2):96-104.
- Guchelaar H-J, Vermes A, Meerwaldt J. 1997. Radiation-induced xerostomia: pathophysiology, clinical course and supportive treatment. *Supportive Care in Cancer* 5(4):281-288.

- Gudkov AV, Gleiberman A. 2008. In Regard to Schuller et al. (int J Radiat Oncol Biol Phys 2007;68:205-210). International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 70(3).
- Guntinas-Lichius O, Wendt T, Buentzel J, Esser D, Lochner P, Mueller A, Schultze-Mosgau S, Altendorf-Hofmann A. 2010. Head and neck cancer in Germany: a site-specific analysis of survival of the Thuringian cancer registration database. Journal of cancer research and clinical oncology 136(1):55-63.
- Hague A, Eveson JW, MacFarlane M, Huntley S, Janghra N, Thavaraj S. 2004. Caspase-3 expression is reduced, in the absence of cleavage, in terminally differentiated normal oral epithelium but is increased in oral squamous cell carcinomas and correlates with tumour stage. J Pathol 204(2):175-82.
- Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z, Kolesnick RN. 1994. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. J Exp Med 180(2):525-35.
- Hakenjos M, Bamberg H, Rodemann L. 2000. TGF-beta1-mediated alterations of rat lung fibroblast differentiation resulting in the radiation-induced fibrotic phenotype. International journal of radiation biology 76(4):503-509.
- Hannun YA, Obeid LM. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. Nature reviews Molecular cell biology 9(2):139-150.
- Hendry JH. 2008. No apoptotic endothelial cells in irradiated intestine: Regarding Schuller et al. (Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007;68:205-210). International Journal of Radiation Oncology Biology Physics 70(3):801-802.
- Henle G, Henle W. 1976. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. Int J Cancer 17(1):1-7.
- Hernández-Corbacho MJ, Canals D, Adada MM, Liu M, Senkal CE, Yi JK, Mao C, Luberto C, Hannun YA, Obeid LM. 2015. Tumor Necrosis Factor- α (TNF α)-induced Ceramide Generation via Ceramide Synthases Regulates Loss of Focal Adhesion Kinase (FAK) and Programmed Cell Death. Journal of Biological Chemistry 290(42):25356-25373.
- Herrmann T, Baumann M. 2005. Die Verlängerung der Wartezeit oder der Gesamtbehandlungszeit durch ungeplante Bestrahlungspausen. Strahlentherapie und Onkologie 181(2):65-76.
- Herrmann T, Baumann M, Dörr W. 2006. Klinische Strahlenbiologie: kurz und bündig: Elsevier, Urban&FischerVerlag.
- Herrmann T, Jakubek A, Trott KR. 1994. The importance of the timing of a gap in radiotherapy of squamous cell carcinomas of the head and neck. Strahlenther Onkol 170(9):545-9.
- Hill M. 1984. Cell renewal in oral epithelia. The structure and function of oral mucosa:53-81.
- Hopewell J, Nyman J, Turesson I. 2003. Time factor for acute tissue reactions following fractionated irradiation: a balance between repopulation and enhanced radiosensitivity. International journal of radiation biology 79(7):513-524.
- Horiot J-C, Bontemps P, Van den Bogaert W, Le Fur R, van den Weijngaert D, Bolla M, Bernier J, Lusinchi A, Stuschke M, Lopez-Torrecilla J. 1997. Accelerated fractionation (AF) compared to conventional fractionation (CF) improves loco-regional control in the radiotherapy of advanced head and neck cancers: results of the EORTC 22851 randomized trial. Radiotherapy and oncology 44(2):111-121.
- Horiot J-C, Lipinski F, Schraub S, Maulard-Durdux C, Bensadoun RJ, Ardiet JM, Bolla M, Coscas Y, Baillet F, Coche-Dequéant B. 2000. Post-radiation severe xerostomia relieved by pilocarpine: a prospective French cooperative study. Radiotherapy and oncology 55(3):233-239.

- Horres CR, Hannun YA. 2012. The roles of neutral sphingomyelinases in neurological pathologies. *Neurochemical research* 37(6):1137-1149.
- Horsman MR, Wouters BG, Joiner MC, Overgaard J. 2009. The oxygen effect and fractionated radiotherapy. *Basic Clinical Radiobiology*: Edward Arnold, London. p 207-216.
- Hume W, Potten C. 1983. Proliferative units in stratified squamous epithelium. *Clinical and experimental dermatology* 8(1):95-106.
- Hume W, Potten CS. 1980. Changes in proliferative activity as cells move along undulating basement membranes in stratified squamous epithelium. *British Journal of Dermatology* 103(5):499-505.
- Hurwitz R, Ferlinz K, Sandhoff K. 1994. The tricyclic antidepressant desipramine causes proteolytic degradation of lysosomal sphingomyelinase in human fibroblasts. *Biological chemistry Hoppe-Seyler* 375(7):447-450.
- Husari AW, Dbaibo GS, Bitar H, Khayat A, Panjarian S, Nasser M, Bitar FF, El-Sabban M, Zaatari G, Mroueh SM. 2006. Apoptosis and the activity of ceramide, Bax and Bcl-2 in the lungs of neonatal rats exposed to limited and prolonged hyperoxia. *Respir Res* 7(1):100.
- Hwang D, Popat R, Bragdon C, O'Donnell KE, Sonis ST. 2005. Effects of ceramide inhibition on experimental radiation-induced oral mucositis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 100(3):321-329.
- Inagaki-Ohara K, Takamura N, Yada S, Alnadjim Z, Liu E, Yu X, Yoshida H, Lin T. 2002. Radiation-induced crypt intestinal epithelial cell apoptosis in vivo involves both caspase-3-dependent and -independent pathways. *Dig Dis Sci* 47(12):2823-30.
- Jaal J, Richter C, Dörr W. 2010. Effect of recombinant human keratinocyte growth factor (Δ 23rHuKGF, Palifermin) on inflammatory and immune changes in mouse tongue during fractionated irradiation. *International journal of radiation biology* 86(10):860-866.
- Jaffrézou J-P, Bruno AP, Moisand A, Levade T, Laurent G. 2001. Activation of a nuclear sphingomyelinase in radiation-induced apoptosis. *The FASEB Journal* 15(1):123-133.
- Jana A, Pahan K. 2004. Fibrillar Amyloid- β Peptides Kill Human Primary Neurons via NADPH Oxidase-mediated Activation of Neutral Sphingomyelinase Implications for Alzheimer's Disease. *Journal of Biological Chemistry* 279(49):51451-51459.
- Janjan N, Weissman D, Pahule A. 1992. Improved pain management with daily nursing intervention during radiation therapy for head and neck carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 23(3):647-652.
- Jensen SB, Jarvis V, Zadik Y, Barasch A, Ariyawardana A, Hovan A, Yarom N, Lalla RV, Bowen J, Elad S. 2013. Systematic review of miscellaneous agents for the management of oral mucositis in cancer patients. *Supportive Care in Cancer* 21(11):3223-3232.
- Jordan RC, Catzavelos GC, Barrett AW, Speight PM. 1996. Differential expression of bcl-2 and bax in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 32B(6):394-400.
- Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. 2006. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *Journal of clinical oncology* 24(14):2137-2150.
- Kamprad F, Ranft D, Weber A, Hildebrandt G. 2008. Functional changes of the gustatory organ caused by local radiation exposure during radiotherapy of the head-and-neck region. *Strahlentherapie und Onkologie* 184(3):157-162.

- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer research* 51(23 Part 1):6304-6311.
- Kazemian A, Kamian S, Aghili M, Hashemi F, Haddad P. 2009. Benzydamine for prophylaxis of radiation-induced oral mucositis in head and neck cancers: a double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *European journal of cancer care* 18(2):174-178.
- Kellett M, Hume W, Potten CS. 1989. A topographical study of the circadian rhythm in labelling index of mouse gingival and floor-of-mouth epithelium, including changes in labelling activity with individual cell position on the epithelial ridges. *Archives of oral biology* 34(5):321-328.
- Kent ML, Brennan MT, Noll JL, Fox PC, Burri SH, Hunter JC, Lockhart PB. 2008. Radiation-induced trismus in head and neck cancer patients. *Supportive Care in Cancer* 16(3):305-309.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26(4):239.
- Kerres K. 2009. Modulation der radiogenen Mucositis enoralis (Maus) durch Keratinozyten-Wachstumsfaktor unter fraktionierter Bestrahlung: histologische und immunhistochemische Untersuchungen, Diss. med.: Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden.
- Kielbassa AM, Hinkelbein W, Hellwig E, Meyer-Lückel H. 2006. Radiation-related damage to dentition. *The lancet oncology* 7(4):326-335.
- Kielbassa AM, Meyer-Lueckel H. 2001. Die Auswirkungen von Speichelersatzmitteln und Mundspüllösungen auf Dentin. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin* 111(9):1060-1074.
- Kim J, Chu F, Lakshmi V, Houde R. 1986. Benzydamine HCl, a new agent for the treatment of radiation mucositis of the oropharynx. *American journal of clinical oncology* 9(2):132-134.
- Kimble RJ, Smith MA, Blitzer GC, Torres AD, Martin JA, Yang RZ, Peet CR, Lorenz LD, Nickel KP, Klingelhutz AJ. 2013. Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer research* 73(15):4791-4800.
- Klammt S. 2005. Einfluss einer Nachbehandlung mit Keratinozyten-Wachstumsfaktor (rHuKGF, Palifermin) auf die Mucositis enoralis (Maus) nach Einzelbestrahlung: histologische und immunhistochemische Untersuchungen.
- Klinkicht-Bormann S. 2013. Beeinflussung der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut durch Lovastatin: Tierexperimentelle Untersuchungen (Maus); Diss. med. Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275(5303):1132-1136.
- Kluth EV, Jain PR, Stuchell RN, Frich JC. 1988. A study of factors contributing to the development of osteoradionecrosis of the jaws. *The Journal of prosthetic dentistry* 59(2):194-201.
- Knee R, Fields RS, Peters LJ. 1985. Concomitant boost radiotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol* 4(1):1-7.
- Kolesnick R. 2002. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *The Journal of clinical investigation* 110(1):3-8.

- Kolesnick R, Fuks Z. 2003. Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 22(37):5897-906.
- Kolesnick RN, Goñi FM, Alonso A. 2000. Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *Journal of cellular physiology* 184(3):285-300.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri E, Baehrecke E, Blagosklonny M, El-Deiry W, Golstein P, Green D. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation* 16(1):3-11.
- Laban S, Wang C, Knecht R, Tribius S, Münscher A. 2012. Neue Aspekte der primären Radiochemotherapie bei Kopf-Hals-Tumoren. *HNO* 60(5):393-397.
- Lalla RV, Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM, McGuire DB, Migliorati C, Nicolatou-Galitis O, Peterson DE. 2014. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer* 120(10):1453-1461.
- Lalla RV, Keefe DM. 2011. Mucositis (oral and gastrointestinal). *The MASCC Textbook of Cancer Supportive Care and Survivorship*: Springer. p 241-248.
- Lambade PN, Lambade D, Goel M. 2013. Osteoradionecrosis of the mandible: a review. *Oral and maxillofacial surgery* 17(4):243-249.
- Lansmann S, Ferlinz K, Hurwitz R, Bartelsen O, Glombitza G, Sandhoff K. 1996. Purification of acid sphingomyelinase from human placenta: Characterization and N-terminal sequence. *FEBS letters* 399(3):227-231.
- Lee H, Rotolo JA, Mesicek J, Penate-Medina T, Rimner A, Liao W-C, Yin X, Ragupathi G, Ehleiter D, Gulbins E. 2011. Mitochondrial ceramide-rich macrodomains functionalize Bax upon irradiation. *PLoS One* 6(6):e19783.
- Lee N, Xia P, Fischbein NJ, Akazawa P, Akazawa C, Quivey JM. 2003. Intensity-modulated radiation therapy for head-and-neck cancer: the UCSF experience focusing on target volume delineation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57(1):49-60.
- Lee S-w, Jung KI, Kim YW, Jung HD, Kim HS, Hong JP. 2007. Effect of epidermal growth factor against radiotherapy-induced oral mucositis in rats. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 67(4):1172-1178.
- Levy M, Futerman AH. 2010. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB life* 62(5):347-356.
- Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biorklund A, Rutqvist LE. 1998. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer* 82(7):1367-75.
- Liao W-C, Haimovitz-Friedman A, Persaud RS, McLoughlin M, Ehleiter D, Zhang N, Gatei M, Lavin M, Kolesnick R, Fuks Z. 1999. Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase. *Journal of Biological Chemistry* 274(25):17908-17917.
- Limpert V. 2014. Die Bedeutung der Apoptose für die Strahlenreaktion der Mundschleimhaut (Maus): Wirkung der Ceramidsynthesehemmung mit Fumonisin B1.
- Lin C-F, Chen C-L, Lin Y-S. 2006. Ceramide in apoptotic signaling and anticancer therapy. *Current medicinal chemistry* 13(14):1609-1616.
- Ling DC, Kabolizadeh P, Heron DE, Ohr JP, Wang H, Johnson J, Kubicek GJ. 2014. Incidence of hospitalization in patients with head and neck cancer treated with intensity-modulated radiation therapy. *Head & neck*.

- Liu B, Andrieu-Abadie N, Levade T, Zhang P, Obeid LM, Hannun YA. 1998. Glutathione regulation of neutral sphingomyelinase in tumor necrosis factor- α -induced cell death. *J Biol Chem* 273(18):11313-20.
- Liu B, Hannun YA. 1997. Inhibition of the neutral magnesium-dependent sphingomyelinase by glutathione. *J Biol Chem* 272(26):16281-7.
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. 1996. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86(1):147-157.
- Lüllmann-Rauch R. 2006. Taschenlehrbuch Histologie. 2., komplett überarbeitete Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart, New York: S.
- Machtay M, Perch S, Markiewicz D, Thaler E, Chalian A, Goldberg A, Kligerman M, Weinstein G. 1997. Combined surgery and postoperative radiotherapy for carcinoma of the base of tongue: analysis of treatment outcome and prognostic value of margin status. *Head & neck* 19(6):494-499.
- Maciejewski B, Zajusz A, Pilecki B, Swiatnicka J, Skladowski K, Dörr W, Kummermehr J, Trott K. 1991. Acute mucositis in the stimulated oral mucosa of patients during radiotherapy for head and neck cancer. *Radiotherapy and oncology* 22(1):7-11.
- Magnoni C, Euclidi E, Benassi L, Bertazzoni G, Cossarizza A, Seidenari S, Giannetti A. 2002. Ultraviolet B radiation induces activation of neutral and acidic sphingomyelinases and ceramide generation in cultured normal human keratinocytes. *Toxicology in vitro* 16(4):349-355.
- Maier H, Dietz A, Gewelke U, Heller WD, Weidauer H. 1992. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin Investig* 70(3-4):320-7.
- Mallick S, Benson R, Rath G. 2015. Radiation induced oral mucositis: a review of current literature on prevention and management. *European archives of oto-rhino-laryngology*:1-9.
- Mancini BR, Wilkinson JB, Kim LH, Shaitelman SF, Yan D, Ionascu D, Grills IS. 2013. Intensity-modulated radiation therapy or volumetric-modulated arc therapy to reduce alopecia, xerostomia, and otitis after whole brain radiation therapy for brain metastases: a planning analysis. *Journal of Radiation Oncology* 2(2):177-183.
- Martín SF, Sawai H, Villalba JM, Hannun YA. 2007. Redox regulation of neutral sphingomyelinase-1 activity in HEK293 cells through a GSH-dependent mechanism. *Archives of biochemistry and biophysics* 459(2):295-300.
- Martinez TN, Chen X, Bandyopadhyay S, Merrill AH, Tansey MG. 2012. Ceramide sphingolipid signaling mediates Tumor Necrosis Factor (TNF)-dependent toxicity via caspase signaling in dopaminergic neurons. *Mol Neurodegener* 7(1):45.
- Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. 2010. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The lancet oncology* 11(8):781-789.
- Marx RE. 1983. A new concept in the treatment of osteoradionecrosis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 41(6):351-357.
- Mathias S, Pena LA, Kolesnick RN. 1998. Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* 335 (Pt 3):465-80.
- McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. 1998. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck* 20(3):250-65.
- Merrill A, van Echten G, Wang E, Sandhoff K. 1991. Fumonisin (splinganine) N-acyltransferase and de nova sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in shn. *J Biol Chem* 266:14486-14490.

- Merrill A, Van Echten G, Wang E, Sandhoff K. 1993. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *Journal of Biological Chemistry* 268(36):27299-27306.
- Merrill Jr AH, Sullards MC, Wang E, Voss KA, Riley RT. 2001. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environmental health perspectives* 109(Suppl 2):283.
- Merritt AJ, Allen TD, Potten CS, Hickman JA. 1997. Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. *Oncogene* 14(23):2759-66.
- Mesicek J, Lee H, Feldman T, Jiang X, Skobeleva A, Berdyshev EV, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick R. 2010. Ceramide synthases 2, 5, and 6 confer distinct roles in radiation-induced apoptosis in HeLa cells. *Cellular signalling* 22(9):1300-1307.
- Miah AB, Bhide SA, Guerrero-Urbano MT, Clark C, Bidmead AM, Rose SS, Barbachano Y, A'Hern R, Tanay M, Hickey J. 2012. Dose-escalated intensity-modulated radiotherapy is feasible and may improve locoregional control and laryngeal preservation in laryngo-hypopharyngeal cancers. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 82(2):539-547.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin H-K, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9(6):1799-1805.
- Molls M. 2013. Prinzipien der Kombination von Radiotherapie und. *Strahlentherapie: Radiologische Onkologie*:189.
- Monnier Y, Broome M, Betz M, Bouferrache K, Ozsahin E, Jaques B. Incidence and risk factors of mandibular osteoradionecrosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oro-pharynx; 2009.
- Morad SA, Cabot MC. 2013. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nature Reviews Cancer* 13(1):51-65.
- Moses R, Kummermehr J. 1986. Radiation response of the mouse tongue epithelium. *The British journal of cancer. Supplement* 7:12.
- Mullen TD, Jenkins RW, Clarke CJ, Bielawski J, Hannun YA, Obeid LM. 2011. Ceramide Synthase-dependent Ceramide Generation and Programmed Cell Death Involvement of Salvage Pathway in Regulating Postmitochondrial Events. *Journal of Biological Chemistry* 286(18):15929-15942.
- Murphy BA. 2007. Clinical and economic consequences of mucositis induced by chemotherapy and/or radiation therapy. *J Support Oncol* 5(9 Suppl 4):13-21.
- Murphy BA, Beaumont JL, Isitt J, Garden AS, Gwede CK, Trotti AM, Meredith RF, Epstein JB, Le QT, Brizel DM and others. 2009. Mucositis-related morbidity and resource utilization in head and neck cancer patients receiving radiation therapy with or without chemotherapy. *J Pain Symptom Manage* 38(4):522-32.
- Murphy CK, Fey EG, Watkins BA, Wong V, Rothstein D, Sonis ST. 2008. Efficacy of superoxide dismutase mimetic M40403 in attenuating radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Clinical cancer research* 14(13):4292-4297.
- Murray LA, Kramer MS, Hesson DP, Watkins BA, Fey EG, Argentieri RL, Shaheen F, Knight DA, Sonis ST. 2010. Research Serum amyloid P ameliorates radiation-induced oral mucositis and fibrosis.
- Nakayama A, Alladin KP, Igbokwe O, White JD. 2011. Systematic review: generating evidence-based guidelines on the concurrent use of dietary antioxidants and chemotherapy or radiotherapy. *Cancer investigation* 29(10):655-667.

- NCI. 2010. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE); Version 4.0. URL: http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_8.5x11.pdf [Aufruf am 28.05.2016](28.05.2009).
- Nelson D, Cox M. 2001. *Lehninger Biochemie*. Berlin: Springer.
- Nickstadt T. 2001. Kapazität und Kinetik der Erholung von subletalen Strahlenschäden in der Mundschleimhaut (Maus) bei Bestrahlung mit 200 kV Röntgenstrahlen; Diss. med. dent. Technische Universität Dresden.
- Nicolatou-Galitis O, Sarri T, Bowen J, Di Palma M, Kouloulas VE, Niscola P, Riesenbeck D, Stokman M, Tissing W, Yeoh E. 2013. Systematic review of anti-inflammatory agents for the management of oral mucositis in cancer patients. *Supportive Care in Cancer* 21(11):3179-3189.
- Oberoi S, Zamperlini-Netto G, Beyene J, Treister NS, Sung L. 2014. Effect of prophylactic low level laser therapy on oral mucositis: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 9(9):e107418.
- Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74(4):609-619.
- Oskam IM, Verdonck-de Leeuw IM, Aaronson NK, Kuik DJ, de Bree R, Doornaert P, Langendijk JA, Leemans RC. 2010. Quality of life as predictor of survival: a prospective study on patients treated with combined surgery and radiotherapy for advanced oral and oropharyngeal cancer. *Radiotherapy and oncology* 97(2):258-262.
- Oton-Leite AF, Elias LSA, Morais MO, Pinezi JCD, Leles CR, Silva MAGS, Mendonça EF. 2013. Effect of low level laser therapy in the reduction of oral complications in patients with cancer of the head and neck submitted to radiotherapy. *Special Care in Dentistry* 33(6):294-300.
- Pabst S, Spekl K, Dorr W. 2004. Changes in the effect of dose fractionation during daily fractionated irradiation: studies in mouse oral mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58(2):485-92.
- Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Kolesnick R. 2001. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293(5528):293-7.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA: a cancer journal for clinicians* 55(2):74-108.
- Parkins CS, Fowler JF, Yu S. 1983. A murine model of lip epidermal/mucosal reactions to X-irradiation. *Radiotherapy and oncology* 1(2):159-165.
- Patwardhan GA, Beverly LJ, Siskind LJ. 2016. Sphingolipids and mitochondrial apoptosis. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 48(2):153-168.
- Perez C, Brady L. 1993a. Acute radiation morbidity scoring criteria (RTOG). Principles and practice of radiation oncology, 2nd ed. Lippincott, Philadelphia:51-53.
- Perez C, Brady L. 1993b. Late radiation morbidity scoring criteria (RTOG, EORTC). Principles and practice of radiation oncology, 2nd edn. Lippincott, Philadelphia:53-55.
- Perry DK. 2002. Serine palmitoyltransferase: role in apoptotic de novo ceramide synthesis and other stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1585(2):146-152.
- Peterman A, Cella D, Glandon G, Dobrez D, Yount S. 2000. Mucositis in head and neck cancer: economic and quality-of-life outcomes. *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*(29):45-51.

- Peterson D, Bensadoun R-J, Roila F, Group EGW. 2011. Management of oral and gastrointestinal mucositis: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology* 22(suppl 6):vi78-vi84.
- Peterson D, Boers-Doets C, Bensadoun R, Herrstedt J. 2015. Management of oral and gastrointestinal mucosal injury: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment, and follow-up. *Annals of Oncology* 26(suppl 5):v139-v151.
- Peterson DE, Dörr W, Hovan A, Pinto A, Saunders D, Elting LS, Spijkervet FK, Brennan MT. 2010. Osteoradionecrosis in cancer patients: the evidence base for treatment-dependent frequency, current management strategies, and future studies. *Supportive Care in Cancer* 18(8):1089-1098.
- Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. 2002. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1585(2-3):114-25.
- Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Iezzi G, Santinelli A. 2002. Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg* 60(5):532-40.
- Pignon JP, Bourhis J, Dumenil C, Designe L. 2000. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer. *Lancet* 355(9208):949-55.
- Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J. 2009. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol* 92(1):4-14.
- Potten CS. 2001. Apoptosis in oral mucosa: lessons from the crypt. A commentary. *Oral Dis* 7(2):81-5.
- Potten CS, Booth D, Cragg N, Tudor GL, O'Shea JA, Appleton D, Barthel D, Gerike T, Meineke F, Loeffler M. 2002. Cell kinetic studies in the murine ventral tongue epithelium: thymidine metabolism studies and circadian rhythm determination. *Cell proliferation* 35(s1):1-15.
- Potten CS, Grant HK. 1998. The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine. *Br J Cancer* 78(8):993-1003.
- Prada A, Lozza L, Moglia D, Sala L, Chiesa F. 1984. Effects of benzydamine on radio-polychemotherapeutic mucositis of the oral cavity. *International journal of tissue reactions* 7(3):237-239.
- Pritzkuleit R, Beske F, Katalinic A. 2010. Demographischer Wandel und Krebserkrankungen in der Zukunft. *Oncology Research and Treatment* 33(Suppl. 7):19-24.
- Quintern LE, Schuchman EH, Levran O, Suchi M, Ferlinz K, Reinke H, Sandhoff K, Desnick R. 1989. Isolation of cDNA clones encoding human acid sphingomyelinase: occurrence of alternatively processed transcripts. *The EMBO journal* 8(9):2469.
- Raber-Durlacher JE, Elad S, Barasch A. 2010. Oral mucositis. *Oral oncology* 46(6):452-456.
- Raber-Durlacher JE, von Bültzingslöwen I, Logan RM, Bowen J, Al-Azri AR, Everaus H, Gerber E, Gomez JG, Pettersson BG, Soga Y. 2013. Systematic review of cytokines and growth factors for the management of oral mucositis in cancer patients. *Supportive Care in Cancer* 21(1):343-355.
- Radvansky LJ, Pace MB, Siddiqui A. 2013. Prevention and management of radiation-induced dermatitis, mucositis, and xerostomia. *American Journal of Health-System Pharmacy* 70(12):1025-1032.

- Rautava J, Kuuskoski J, Syrjänen K, Grenman R, Syrjänen S. 2012. HPV genotypes and their prognostic significance in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of clinical virology* 53(2):116-120.
- Redda MGR, Allis S. 2006. Radiotherapy-induced taste impairment. *Cancer treatment reviews* 32(7):541-547.
- Reitemeier B, Reitemeier G, Schmidt A, Schaald W, Blochberger P, Lehmann D, Herrmann T. 2002. Evaluation of a device for attenuation of electron release from dental restorations in a therapeutic radiation field. *The Journal of prosthetic dentistry* 87(3):323-327.
- Rezvani M, Ross G. 2004. Modification of radiation-induced acute oral mucositis in the rat. *International journal of radiation biology* 80(2):177-182.
- Ribeiro DA, Salvadori DM, Marques ME. 2005. Abnormal expression of bcl-2 and bax in rat tongue mucosa during the development of squamous cell carcinoma induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Int J Exp Pathol* 86(6):375-81.
- Richter E, Feyerabend T. 1996. Spezielle Strahlentherapie maligner Tumoren. *Grundlagen der Strahlentherapie*: Springer. p 171-395.
- Richter E, Feyerabend T. 2002. Patientenbetreuung. *Grundlagen der Strahlentherapie*: Springer. p 423-439.
- Riesenbeck D, Dörr W. 1998. Documentation of radiation-induced oral mucositis. Scoring systems. *Strahlenther Onkol* 174 Suppl 3:44-6.
- Rivina L, Davoren M, Schiestl RH. 2014. Radiation-induced lung cancers in murine models. *Advances in Lung Cancer* 2014.
- RKI. 2013. Krebs in Deutschland 2009/2010. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin.
- RKI. 2015. Krebs in Deutschland 2011/2012. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin.
- RKI. 2016. Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016; Robert Koch-Institut; URL: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebsgeschehen/Krebsgeschehen_download.pdf?__blob=publicationFile [Aufruf am 18.02.2017].
- Robertson AG, Robertson C, Perone C, Clarke K, Dewar J, Elia MH, Hurman D, MacDougall RH, Yosef HM. 1998. Effect of gap length and position on results of treatment of cancer of the larynx in Scotland by radiotherapy: a linear quadratic analysis. *Radiother Oncol* 48(2):165-73.
- Rodemann HP, Bamberg M. 1995. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiotherapy and oncology* 35(2):83-90.
- Rodriguez-Lafrasse C, Alphonse G, Aloy MT, Ardail D, Gerard JP, Louisot P, Rousson R. 2002. Increasing endogenous ceramide using inhibitors of sphingolipid metabolism maximizes ionizing radiation-induced mitochondrial injury and apoptotic cell killing. *Int J Cancer* 101(6):589-98.
- Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, Goran Hansson B, Andersson G. 2005. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* 125(12):1327-36.
- Rosenthal DI, Trotti A. Strategies for managing radiation-induced mucositis in head and neck cancer; 2009. Elsevier. p 29-34.
- Ross G. 1999. Induction of cell death by radiotherapy. *Endocrine-related cancer* 6(1):41-44.

- Rotolo J, Stancevic B, Zhang J, Hua G, Fuller J, Yin X, Haimovitz-Friedman A, Kim K, Qian M, Cardo-Vila M and others. 2012. Anti-ceramide antibody prevents the radiation gastrointestinal syndrome in mice. *J Clin Invest* 122(5):1786-90.
- Russo G, Haddad R, Posner M, Machtay M. 2008. Radiation Treatment Breaks and Ulcerative Mucositis in Head and Neck Cancer. *The Oncologist Head and Neck Cancers*(13):886-898.
- Santana P, Pena LA, Haimovitz-Friedman A, Martin S, Green D, McLoughlin M, Cordon-Cardo C, Schuchman EH, Fuks Z, Kolesnick R. 1996. Acid sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis. *Cell* 86(2):189-99.
- SAS. 1990. SAS/STAT user's guide : Version 9. Cary, NC: SAS Institute.
- Sasse AD, de Oliveira Clark LG, Sasse EC, Clark OAC. 2006. Amifostine reduces side effects and improves complete response rate during radiotherapy: results of a meta-analysis. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 64(3):784-791.
- Schmidt H. 2009. Beeinflussung der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut durch den Immunmodulator WF10: Tierexperimentelle Untersuchungen, Diss. med.: Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden.
- Schöllner J. 2015. Modifikation der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut (Maus) durch Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase mittels nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME), Diss. med. vet. Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.
- Schreiber T. 2012. Beeinflussung der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut durch die Blockade des Rezeptors für den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) mittels des EGFR-Tyrosinkinaseinhibitors Erlotinib: tierexperimentelle Untersuchungen, Diss. med.: Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden.
- Schuchman E, Suchi M, Takahashi T, Sandhoff K, Desnick R. 1991. Human acid sphingomyelinase. Isolation, nucleotide sequence and expression of the full-length and alternatively spliced cDNAs. *Journal of Biological Chemistry* 266(13):8531-8539.
- Schuller BW, Rogers AB, Cormier KS, Riley KJ, Binns PJ, Julius R, Hawthorne MF, Coderre JA. 2007. No significant endothelial apoptosis in the radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68(1):205-10.
- Schultz DR, Harrington WJ. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level; 2003. Elsevier. p 345-369.
- Schumacher G-H. 1997. Anatomie für Zahnmediziner: Lehrbuch und Atlas: Hüthig.
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U. 2012. Prometheus. LernAtlas der Anatomie. Kopf, Hals und Neuroanatomie. Illustrationen von M. Voll und K. Wesker. Stuttgart: Thieme.
- Schütze S, Wiegmann K, Machleidt T, Krönke M. 1995. TNF-induced activation of NF- κ B. *Immunobiology* 193(2):193-203.
- Schweyen R, Hey J, Fränzel W, Vordermark D, Hildebrandt G, Kuhnt PDT. 2012. Radiogene Karies: Ätiologie und Möglichkeiten der Prävention. *Strahlentherapie und Onkologie* 188(1):21-28.
- Schwiedergoll S. 2012. Modifikation der Strahlenreaktion der Mundschleimhaut (Maus) durch Blockade von TNF- α mittels des monoklonalen Antikörpers Infliximab, Diss. med.: Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden.
- Sciubba JJ, Goldenberg D. 2006. Oral complications of radiotherapy. *The lancet oncology* 7(2):175-183.
- Scully C, Epstein JB. 1996. Oral health care for the cancer patient. *European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology* 32(5):281-292.

- Seeber S, Schütte J. 2007. Therapiekonzepte Onkologie: Springer-Verlag.
- Seegenschmiedt MH. 2013. Nebenwirkungen in der Onkologie: internationale Systematik und Dokumentation: Springer-Verlag.
- Sert C, Çelik MS, Akdağ Z, Ketani MA, Nergiz Y. 2000. The radioprotective effect of vitamins C, E and vitamin E+ glutathione on the small intestine and the thyroid gland in rats irradiated with x-rays. *Turkish Journal of Medical Sciences* 30(5):417-426.
- Shin YS, Shin HA, Kang SU, Kim JH, Oh YT, Park KH, Kim CH. 2013. Effect of epicatechin against radiation-induced oral mucositis: in vitro and in vivo study. *PLoS One* 8(7):e69151.
- Siegemund E. 2010. Optimierung des Applikationsprotokolls des rekombinanten humanen Keratinozyten-Wachstumsfaktor Palifermin zur Reduktion der radiogenen oralen Mukositis nach einseitiger Strahlenexposition: Untersuchungen an der Mundschleimhaut der Maus, Diss. med. vet.: Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig.
- Sinclair W, Morton R. 1965. X-ray and ultraviolet sensitivity of synchronized Chinese hamster cells at various stages of the cell cycle. *Biophysical journal* 5(1):1.
- Somers RH. 1962. A new asymmetric measure of association for ordinal variables. *American sociological review*:799-811.
- Sonis S. 2010. New thoughts on the initiation of mucositis. *Oral diseases* 16(7):597-600.
- Sonis ST. 2002. Animal models of oral mucositis induced by antineoplastic drugs and radiation. *Tumor models in cancer research: Springer*. p 323-335.
- Sonis ST. 2004. The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* 4(4):277-84.
- Sonis ST. 2007. Pathobiology of oral mucositis: novel insights and opportunities. *J Support Oncol* 5(9 Suppl 4):3-11.
- Sonis ST. 2011. Oral mucositis. *Anticancer Drugs* 22(7):607-612.
- Sonis ST. Oral mucositis in head and neck cancer: risk, biology, and management; 2013. American Society of Clinical Oncology.
- Sonis ST, Eilers JP, Epstein JB, LeVeque FG, Liggett WH, Mulagha MT, Peterson DE, Rose AH, Schubert MM, Spijkervet FK. 1999. Validation of a new scoring system for the assessment of clinical trial research of oral mucositis induced by radiation or chemotherapy. *Cancer* 85(10):2103-2113.
- Sonis ST, Tracey C, Shklar G, Jenson J, Florine D. 1990. An animal model for mucositis induced by cancer chemotherapy. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology* 69(4):437-443.
- Staar S, Rudat V, Stuetzer H, Dietz A, Volling P, Schroeder M, Flentje M, Eckel HE, Mueller RP. 2001. Intensified hyperfractionated accelerated radiotherapy limits the additional benefit of simultaneous chemotherapy--results of a multicentric randomized German trial in advanced head-and-neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50(5):1161-71.
- Statistisches Bundesamt. 2016. Statistisches Jahrbuch 2016; URL: https://www.destatis.de/DE/Publikationen/StatistischesJahrbuch/Gesundheit.pdf?__blob=publicationFile [Aufruf am 18.02.2017].
- Steel GG, McMillan TJ, Peacock J. 1989. The 5Rs of radiobiology. *International journal of radiation biology* 56(6):1045-1048.
- Stoffel W. 1999. Functional analysis of acid and neutral sphingomyelinases in vitro and in vivo. *Chemistry and physics of lipids* 102(1):107-121.

- Stokman M, Spijkervet F, Boezen H, Schouten J, Roodenburg J, De Vries E. 2006. Preventive intervention possibilities in radiotherapy-and chemotherapy-induced oral mucositis: results of meta-analyses. *Journal of dental research* 85(8):690-700.
- Syrjänen S. 2005. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Journal of clinical virology* 32:59-66.
- Tait SW, Green DR. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology* 11(9):621-632.
- Talwar S, House R, Sundaramurthy S, Balasubramanian S, Yu H, Palanisamy V. 2013. Inhibition of caspases protects mice from radiation induced oral mucositis and abolishes the cleavage of RNA binding protein HuR. *J Biol Chem*.
- Teguh DN, Levendag PC, Voet P, van der Est H, Noever I, de Kruijf W, van Rooij P, Schmitz PI, Heijmen BJ. 2008. Trismus in patients with oropharyngeal cancer: relationship with dose in structures of mastication apparatus. *Head & neck* 30(5):622-630.
- Thames HD, Hendry JH. 1987. Fractionation in radiotherapy: Taylor and Franc's London et al.
- Thames HD, Schultheiss TE, Hendry JH, Tucker SL, Dubray BM, Brock WA. 1992. Can modest escalations of dose be detected as increased tumor control? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 22(2):241-6.
- Thomas A, El Roubi S, Reed JC, Krajewski S, Silber R, Potmesil M, Newcomb EW. 1996. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* 12(5):1055-1062.
- Tolleson WH, Melchior WB, Morris SM, McGarrity LJ, Domon OE, Muskhelishvili L, James SJ, Howard PC. 1996. Apoptotic and anti-proliferative effects of fumonisin B1 in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma cells. *Carcinogenesis* 17(2):239-249.
- Tomiuk S, Hofmann K, Nix M, Zumbansen M, Stoffel W. 1998. Cloned mammalian neutral sphingomyelinase: Functions in sphingolipid signaling? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(7):3638-3643.
- Tomiuk S, Zumbansen M, Stoffel W. 2000. Characterization and subcellular localization of murine and human magnesium-dependent neutral sphingomyelinase. *Journal of Biological Chemistry* 275(8):5710-5717.
- Trott K-R, Dörr W, Herrmann T. 2002. Strahlenwirkungen auf Normalgewebe. München: Urban & Vogel.
- Trotti A, Bellm LA, Epstein JB, Frame D, Fuchs HJ, Gwede CK, Komaroff E, Nalysnyk L, Zilberberg MD. 2003. Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: a systematic literature review. *Radiother Oncol* 66(3):253-62.
- Turnbull R. 1995. Benzydamine Hydrochloride (Tantum) in the management of oral inflammatory conditions. *Journal (Canadian Dental Association)* 61(2):127-134.
- Uchida Y. 2014. Ceramide signaling in mammalian epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* 1841(3):453-462.
- Üçüncü H, Ertekin MV, Yörük Ö, Sezen O, Özkan A, Erdoğan F, Kızıltunç A, Gündoğdu C. 2006. Vitamin E and L-carnitine, separately or in combination, in the prevention of radiation-induced oral mucositis and myelosuppression: a controlled study in a rat model. *Journal of radiation research* 47(1):91-102.

- van Blitterswijk WJ, Veldman RJ, Verheij M, Borst J. 2003. Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochemical Journal* 369(2):199-211.
- Vera-Llonch M, Oster G, Hagiwara M, Sonis S. 2006. Oral mucositis in patients undergoing radiation treatment for head and neck carcinoma. *Cancer* 106(2):329-36.
- Vlachaki MT, Meyn RE. 1998. ASTRO research fellowship: the role of BCL-2 and glutathione in an antioxidant pathway to prevent radiation-induced apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42(1):185-90.
- von Haefen C, Wieder T, Gillissen B, Starck L, Graupner V, Dorken B, Daniel PT. 2002. Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene* 21(25):4009-19.
- Wang C. 1988. Local control of oropharyngeal carcinoma after two accelerated hyperfractionation radiation therapy schemes. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 14(6):1143-1146.
- Wang CC. 1992. Oral cavity. In: Perez CAaB, L.W., editor. *Principles and Practice of Radiation Oncology*. Philadelphia: JB Lipincott. p 672-673.
- Wannenmacher M, Debus J, Wenz F, Bahnsen J. 2013. *Allgemeine Grundlagen. Strahlentherapie*: Springer. p 3-10.
- Warnakulasuriya K, MacDonald D. 1993. Diurnal variation in labelling index in human buccal epithelium. *Archives of oral biology* 38(12):1107-1111.
- Watkins B, Pouliot K, Fey E, Tuthill C, Sonis S. 2010. Attenuation of radiation- and chemoradiation-induced mucositis using gamma-d-glutamyl-L-tryptophan (SCV-07). *Oral diseases* 16(7):655-660.
- Watters D. 1999. Molecular mechanisms of ionizing radiation-induced apoptosis. *Immunology and cell biology* 77(3):263-271.
- Weber K-J, Wenz F. 2013. *Strahlenbiologische Grundlagen. Strahlentherapie*: Springer. p 47-85.
- Weil MM, Stephens LC, Amos CI, Ruifrok AC, Mason KA. 1996. Strain difference in jejunal crypt cell susceptibility to radiation-induced apoptosis. *Int J Radiat Biol* 70(5):579-85.
- Welsch U. 2010. *Lehrbuch Histologie*: Elsevier, Urban&FischerVerlag.
- Wendt TG, Grabenbauer GG, Rodel CM, Thiel HJ, Aydin H, Rohloff R, Wustrow TP, Iro H, Popella C, Schalhorn A. 1998. Simultaneous radiochemotherapy versus radiotherapy alone in advanced head and neck cancer: a randomized multicenter study. *J Clin Oncol* 16(4):1318-24.
- Wendt TG, Waldfahrer F, Iro H. 2010. Tumoren im Kopf-und Halsbereich. *Die Onkologie*:1300-1334.
- WHO. 1979. WHO handbook for reporting results of cancer treatment; URL: http://whqlibdoc.who.int/offset/WHO_OFFSET_48.pdf [Aufruf am 18.02.2017].
- Williams JP, Brown SL, Georges GE, Hauer-Jensen M, Hill RP, Huser AK, Kirsch DG, MacVittie TJ, Mason KA, Medhora MM. 2010. Animal models for medical countermeasures to radiation exposure. *Radiation research* 173(4):557-578.
- Withers H, Taylor J, Maciejewski B. 1988. The hazard of accelerated tumor clonogen repopulation during radiotherapy. *Acta Oncologica* 27(2):131-146.
- Withers HR. 1975a. Cell Cycle Redistribution as a Factor in Multifraction Irradiation 1. *Radiology* 114(1):199-202.
- Withers HR. 1975b. The four R's of radiotherapy. *Adv Radiat Biol* 5(3):241-271.

- Withers HR, Peters LJ, Taylor JM, Owen JB, Morrison WH, Schultheiss TE, Keane T, O'Sullivan B, van Dyk J, Gupta N. 1995. Local control of carcinoma of the tonsil by radiation therapy: an analysis of patterns of fractionation in nine institutions. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 33(3):549-562.
- Wittekind C. 2014. *TNM atlas*: John Wiley & Sons.
- Wu BX, Clarke CJ, Hannun YA. 2010. Mammalian neutral sphingomyelinases: regulation and roles in cell signaling responses. *Neuromolecular medicine* 12(4):320-330.
- Wu J, Liu F, Nilsson Å, Duan R-D. 2004. Pancreatic trypsin cleaves intestinal alkaline sphingomyelinase from mucosa and enhances the sphingomyelinase activity. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 287(5):G967-G973.
- Wu J, Nilsson Å, Jönsson BA, Stenstad H, Agace W, Cheng Y, Duan R-D. 2006. Intestinal alkaline sphingomyelinase hydrolyses and inactivates platelet-activating factor by a phospholipase C activity. *Biochemical Journal* 394(1):299-308.
- Wu X, Chen P, Sonis ST, Lingen MW, Berger A, Toback FG. 2012. A novel Peptide to treat oral mucositis blocks endothelial and epithelial cell apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 83(3):e409-15.
- Wyllie AH, Kerr JR, Currie A. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology* 68:251-306.
- Yabu T, Imamura S, Yamashita M, Okazaki T. 2008. Identification of Mg²⁺-dependent neutral sphingomyelinase 1 as a mediator of heat stress-induced ceramide generation and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 283(44):29971-29982.
- Yabu T, Shiba H, Shibasaki Y, Nakanishi T, Imamura S, Touhata K, Yamashita M. 2015. Stress-induced ceramide generation and apoptosis via the phosphorylation and activation of nSMase1 by JNK signaling. *Cell Death & Differentiation* 22(2):258-273.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng T-I, Jones DP, Wang X. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275(5303):1129-1132.
- Yardley HJ, Summerly R. 1981. Lipid composition and metabolism in normal and diseased epidermis. *Pharmacol Ther* 13(2):357-83.
- Yin X-M, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. 1994. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369(6478):321-323.
- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. 2001. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 92(1):57-70.
- Zips D. 2009. Tumour growth and response to radiation. *Basic Clinical Radiobiology*:78-101.
- Zumbansen M, Stoffel W. 2002. Neutral sphingomyelinase 1 deficiency in the mouse causes no lipid storage disease. *Molecular and cellular biology* 22(11):3633-3638.
- Zundel W, Giaccia A. 1998. Inhibition of the anti-apoptotic PI (3) K/Akt/Bad pathway by stress. *Genes & development* 12(13):1941-1946.

10 Anhang

10.1 Versuchstierhaltung im Experimentellen Zentrum: SPF-Bedingungen

Die Mäuse wurden auf folgende Mikroorganismen getestet:

Viren	Bakterien/Pilze	Parasiten
<ul style="list-style-type: none"> - Adenovirus der Maus (MAd) - Ektromelievirus - Mäusehepatitisvirus (MHV) - Minute Virus of Mice (MVM) - Mouse Parvovirus (MPV) - Pneumonievirus der Maus (PVM) - Reovirus Typ 3 (Reo3) - Rotavirus der Maus (EDIM) - Sendaivirus - Theilersches Encephalomyelitisvirus der Maus (TMEV) - Virus der lymphozytären Choriomeningitis (LCM) - Zytomegalievirus der Maus (MCMV) 	<ul style="list-style-type: none"> - Bordetella bronchiseptica - Citrobacter rhodentium - Clostridium piliforme (Tyzzer's Disease) - Corynebacterium kutscheri - E. coli - Helicobacter spp. - Klebsiella oxytoca - Klebsiella pneumoniae - Mycoplasma spp. - Pasteurellaceae - Proteus spp. - Pseudomonas aeruginosa - Salmonella spp. - Staphylococcus aureus - Streptobacillus moniliformis - Streptococcus pneumoniae - Streptococcus spp. β-hämolyzierend 	<ul style="list-style-type: none"> - Arthropoden - Aspicularis spp. - Giardia spp. - Kokzidien - Sonstige Flagellaten - Spironucleus muris - Syphacia spp. - Trichomonas spp.

10.2 Reagenzien

10.2.1 Allgemeine Reagenzien

- Aqua dest. (Ionenaustauscher-Patronen, Weinert Wassertechnik GmbH, Dresden)
- Ethanol 80 %, 96 %, *absolutus* (vergällt mit 1 % MEK, Berkel AHK Alkoholhandel GmbH & Co. KG, Berlin)
- Xylol (Isomerengemisch) Technical (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Hämatoxylin krist. für Mikroskopie ($C_{16}H_{14}O_6$) (Merck KGaA, Darmstadt)
- Natriumjodat krist. ($NaJO_3$) (Merck KGaA, Darmstadt)
- Kalialaun (Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat, $KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$) (Merck KGaA, Darmstadt)
- Chloralhydrat (Trichlorethandiol, $C_2H_3Cl_3O_2$) (Merck KGaA, Darmstadt)
- Zitronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7 \times H_2O$) (Merck KGaA, Darmstadt)
- Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$) (VWR International GmbH, Darmstadt)
- alkalische Eosinlösung 1 % (Hersteller: Seipt)
- Tris (Trishydroxyaminomethan, $C_4H_{11}NO_3$) (Pufferan® $\geq 99,9\%$, Ultraqualität, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Natriumchlorid ($NaCl$) (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Salzsäure rauchend 37 % (HCl) (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Tween® 20 (Polysorbat) (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Wasserstoffperoxid 35 % (H_2O_2) (Merck KGaA, Darmstadt)
- Entellan® neu (Merck KGaA, Darmstadt)

10.2.2 Pufferlösungen

- Stammlösung 10 x TBS: 0,5 M Tris
1,5 M Natriumchlorid
pH 7,6; eingestellt durch Zugabe von Salzsäure
- Gebrauchslösung TBS: 100 ml 10 x TBS + 900 ml Aqua dest.
- Gebrauchslösung TBS-T: 100 ml 10 x TBS + 900 ml Aqua dest.
+ 0,5 ml Tween® 20
- Stammlösung 10 x PBS: 1,37 M $NaCl$
26,8 mM KCl
80,9 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
17,6 mM KH_2PO_4
- Gebrauchslösung PBS: 100 ml 10 x PBS + 900 ml Aqua dest.
- Citratpuffer: 18 ml 0,1 M Zitronensäure
+ 82 ml 0,1 M Natriumcitratlösung
+ 900 ml Aqua dest.

10.2.3 Reagenzien der HE-Färbung

- Xylol
- Absteigende Alkoholreihe: 2 x Ethanol absolutus, Ethanol 90 %, Ethanol 80 %, Ethanol 70 %, Ethanol 40 %
- Mayers Hämalalaun:
 - 3,31 mM Hämatoxylin krist.
 - 1 mM Natriumjodat krist.
 - 105,4 mM Kalialaun
 - 302,3 mM Chloralhydrat
 - 4,8 mM Zitronensäure-Monohydrat
- 0,5 %ige Eosinlösung: 100 ml alkalische Eosinlösung 1 % auf 100 ml Ethanol 96 %
- Aufsteigende Alkoholreihe: 2 x Ethanol 96 %, 2 x Ethanol *absolutus*
- Entellan[®]

10.2.4 Reagenzien der immunhistochemischen Färbung von cleaved Caspase-3

Primärantikörper: rabbit polyclonal Antibody cleaved Caspase-3 (Asp 175; # 9661, Cell Signaling, Beverly); IgG-Konzentration: 79 µg/ml, Verdünnung: 1:400

Negativkontrolle: rabbit IgG polyclonal antibody (# DLN-13121, dianova GmbH, Hamburg); IgG-Konzentration: 1,0 mg/ml, Verdünnung: 1:5080

Vectastain[®] Elite[®] ABC Kit (Rabbit IgG: PK-6101, Vector Laboratories, Burlingame, USA):

- Blockierungslösung: 950 µl TBS + 50 µl normal goat serum
 - Sekundärantikörper: 995 µl TBS-T + 5 µl Biotinylated Anti-Rabbit IgG
 - ABC: 1000 µl TBS + 20 µl Reagenz A + 20 µl Reagenz B
vor Gebrauch 30 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen
- Pufferlösungen: TBS, TBS-T, Citratpuffer (siehe 10.2.2)

10.2.5 Reagenzien der immunhistochemischen Färbung von Ki-67

Primärantikörper: Rat Monoclonal Anti-Mouse Ki-67, Clone Tec-3 (L-16: sc-9936, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg); IgG-Konzentration: 200 µg/ml, Verdünnung: 1:200,

Negativkontrolle: Normal Rat IgG (sc-2028, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg); IgG-Konzentration: 400 µg/ml, Verdünnung: 1:400

Vectastain[®] Elite[®] ABC Kit (Goat IgG: PK-6105, Vector Laboratories, Burlingame, USA):

- Blockierungslösung: 1000 µl PBS + 15 µl Normal Rabbit Serum
- Sekundärantikörper: 1000 µl PBS + 15 µl Normal Rabbit Serum
+ 5 µl Biotinylated Antibody: Anti-Goat IgG
- ABC: 1000 µl PBS + 20 µl Reagenz A + 20 µl Reagenz B
vor Gebrauch 30 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen

- Pufferlösungen: PBS, Citratpuffer (siehe 10.2.2)

10.2.6 Reagenzien der immunhistochemischen Färbung von Bcl-2

Primärantikörper: goat polyclonal Bcl-2 (N-19) Antibody (# sc-492, Santa Cruz Biotechnology); IgG-Konzentration: 200 µg/ml, Verdünnung: 1:400

Negativkontrolle: normal goat IgG (# sc 2028, Santa Cruz Biotechnology); IgG-Konzentration 400 µg/ml, Verdünnung: 1:800

Vectastain® Elite® ABC Kit (Goat IgG: PK-6101, Vector Laboratories, Burlingame, USA):

- Blockierungslösung: 950 µl PBS + 50 µl normal goat serum
- Sekundärantikörper: 995 µl PBS + 5 µl Biotinylated Anti-Goat IgG
- ABC: 1000 µl PBS + 20 µl Reagenz A + 20 µl Reagenz B
vor Gebrauch 30 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen

Pufferlösungen: PBS, TBS, TBS-T, Citratpuffer (siehe 10.2.2)

10.2.7 Reagenzien der immunhistochemischen Färbung von Bax

Primärantikörper: rabbit polyclonal Bax (P-19) Antibody (# sc-526, Santa Cruz Biotechnology); IgG-Konzentration: 200 µg/ml, Verdünnung: 1:400

Negativkontrolle: rabbit IgG polyclonal antibody (# DLN-13121, dianova GmbH, Hamburg); IgG-Konzentration: 1,0 mg/ml, Verdünnung: 1:2000

Vectastain® Elite® ABC Kit (Rabbit IgG: PK-6101, Vector Laboratories, Burlingame, USA):

- Blockierungslösung: 950 µl PBS + 50 µl normal goat serum
- Sekundärantikörper: 995 µl PBS + 5 µl Biotinylated Anti-Rabbit IgG
- ABC: 1000 µl PBS + 20 µl Reagenz A + 20 µl Reagenz B
vor Gebrauch 30 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen

Pufferlösungen: PBS, TBS, TBS-T, Citratpuffer (siehe 10.2.2)

10.2.8 Reagenzien der immunhistochemischen Färbung von nSMase

Primärantikörper: Monoclonal mouse nSMase (B-1) Antibody (# sc-377135, Santa Cruz Biotechnology); IgG_{2a}-Konzentration: 200 µg/ml, Verdünnung: 1:300

Negativkontrolle: normal mouse IgG (# sc-2025, Santa Cruz Biotechnology); Mouse IgG Konzentration 200µg/ml, Verdünnung: 1:300

Animal Research Kit DAKO # K3955: enthält Biotinylierung- und Blockierungsreagenz, Diluent, DAB+ Substrat-Chromogen

Pufferlösungen: PBS, Citratpuffer (siehe 10.2.2)

10.2.9 Reagenzien der immunhistochemischen Färbung von Ceramid

Primärantikörper: Mouse monoclonal IgM Antibody, Klon MID15B4 (# ALX-804-196, ENZO);

IgG-Konzentration: 200 µg/ml, Verdünnung: 1:50

Negativkontrolle: normal mouse IgM (# sc-3881, Santa Cruz Biotechnology);

IgM-Konzentration: 50 µg/ml, Verdünnung: 1:12,5

Animal Research Kit DAKO # K3955: enthält Biotinylierung- und Blockierungsreagenz, Diluent, DAB+ Substrat-Chromogen

Pufferlösungen: PBS, TBS, TBS-T, Citratpuffer (siehe 10.2.2)

10.2.10 Reagenzien der immunhistochemischen Färbung von CD31

Primärantikörper: rabbit polyclonal PECAM-1 (M-20)Antibody (# sc-1506-R, Santa Cruz Biotechnology); IgG-Konzentration: 100 µg/ml, Verdünnung: 1:2500

Negativkontrolle: rabbit IgG polyclonal antibody (# DLN-13121, dianova GmbH, Hamburg);

IgG-Konzentration: 1,0 mg/ml, Verdünnung: 1:2000

Vectastain® Elite® ABC Kit (Rabbit IgG: PK-6101, Vector Laboratories, Burlingame, USA):

- Blockierungslösung: 970 µl PBS + 30 µl normal goat serum
- Sekundärantikörper: 995 µl PBS + 5 µl Biotinylated Anti-Rabbit IgG
- ABC: 1000 µl PBS + 20 µl Reagenz A + 20 µl Reagenz B
vor Gebrauch 30 min bei Raumtemperatur inkubieren lassen

Pufferlösungen: PBS, Citratpuffer (siehe 10.2.2)

10.2.11 Sonstige Reagenzien zur immunhistochemischen Färbung

- Xylol
- Alkoholreihe: 2 x Ethanol absolutus, Ethanol 90 %, Ethanol 80 %, Ethanol 70 %, Ethanol 40 %
- Wasserstoffperoxid (3 %ige Lösung, verdünnt in Leitungswasser)
- Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (K3468, Fa. Dako Deutschland GmbH, Hamburg): 1000 µl Substratpuffer + 20 µl DAB+ Chromogen; dunkel lagern
- Mayers Hämalaun (siehe 10.2.3)
- Entellan®

10.3 Histologische Untersuchungen

10.3.1 Zellzahlen

Tab. 23: Verlauf der absoluten und relativen Zellzahlen während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen und der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit (Versuch H0).

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht	
	Zellzahl/mm MW \pm SEM	%	Zellzahl/mm MW \pm SEM	%	Zellzahl/mm MW \pm SEM	%
3	482 \pm 10	100 \pm 2	336 \pm 8	100 \pm 2	146 \pm 5	100 \pm 3
1	438 \pm 9	91 \pm 2	302 \pm 6	90 \pm 2	136 \pm 5	93 \pm 4
3	362 \pm 8	75 \pm 2	264 \pm 6	79 \pm 2	99 \pm 5	68 \pm 4
5	330 \pm 8	68 \pm 2	242 \pm 8	72 \pm 3	88 \pm 4	60 \pm 3
7	438 \pm 36	91 \pm 8	330 \pm 25	98 \pm 7	108 \pm 13	74 \pm 9
9	335 \pm 9	70 \pm 2	240 \pm 9	71 \pm 3	95 \pm 1	65 \pm 1
11	373 \pm 19	78 \pm 4	281 \pm 15	84 \pm 5	92 \pm 5	63 \pm 4
13	343 \pm 11	71 \pm 2	255 \pm 9	76 \pm 3	89 \pm 3	61 \pm 2
15	539 \pm 15	112 \pm 3	400 \pm 13	119 \pm 4	139 \pm 2	95 \pm 1
17	554 \pm 32	115 \pm 7	402 \pm 21	120 \pm 6	152 \pm 11	104 \pm 8
19	505 \pm 18	105 \pm 4	368 \pm 13	110 \pm 4	137 \pm 6	94 \pm 4
21	528 \pm 27	110 \pm 6	395 \pm 22	118 \pm 7	133 \pm 5	91 \pm 3
23	551 \pm 22	114 \pm 5	406 \pm 18	121 \pm 5	145 \pm 5	99 \pm 3
25	561 \pm 39	116 \pm 8	421 \pm 36	125 \pm 11	140 \pm 6	96 \pm 4

Tab. 24: Verlauf der absoluten und relativen Zellzahlen während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen, der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit und der Behandlung mit Glutathion (Versuch H1).

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht	
	Zellzahl/mm MW \pm SEM	%	Zellzahl/mm MW \pm SEM	%	Zellzahl/mm MW \pm SEM	%
-3	482 \pm 10	100 \pm 2	336 \pm 8	100 \pm 2	146 \pm 5	100 \pm 3
-1	406 \pm 11	84 \pm 2	281 \pm 8	84 \pm 2	125 \pm 8	86 \pm 5
1	445 \pm 15	92 \pm 3	308 \pm 6	92 \pm 8	137 \pm 10	94 \pm 7
3	378 \pm 12	78 \pm 3	262 \pm 11	78 \pm 3	115 \pm 4	79 \pm 3
5	331 \pm 6	69 \pm 1	244 \pm 4	73 \pm 1	87 \pm 3	60 \pm 2
7	388 \pm 13	81 \pm 3	286 \pm 12	85 \pm 4	103 \pm 2	71 \pm 2
9	309 \pm 10	64 \pm 2	219 \pm 7	65 \pm 2	90 \pm 4	62 \pm 3
11	340 \pm 13	71 \pm 3	246 \pm 9	73 \pm 3	94 \pm 5	65 \pm 3
13	457 \pm 40	95 \pm 8	327 \pm 24	97 \pm 7	130 \pm 17	89 \pm 11
15	565 \pm 14	117 \pm 3	429 \pm 13	128 \pm 4	136 \pm 7	93 \pm 5
17	638 \pm 23	132 \pm 5	455 \pm 15	135 \pm 4	184 \pm 10	126 \pm 7
19	503 \pm 31	105 \pm 7	361 \pm 25	108 \pm 7	142 \pm 7	97 \pm 5
21	512 \pm 29	106 \pm 6	371 \pm 2	110 \pm 1	141 \pm 11	97 \pm 7
23	474 \pm 12	98 \pm 2	358 \pm 13	107 \pm 4	115 \pm 5	79 \pm 3
25	516 \pm 12	107 \pm 3	373 \pm 9	111 \pm 3	142 \pm 4	97 \pm 3

Tab. 25: Verlauf der absoluten und relativen Zellzahlen während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen, der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit und der Behandlung mit Fumonisin B1 (Versuch H2).

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht	
	Zellzahl/mm MW \pm SEM	%	Zellzahl/mm MW \pm SEM	%	Zellzahl/mm MW \pm SEM	%
-3	482 \pm 10	100 \pm 2	336 \pm 8	100 \pm 2	146 \pm 5	100 \pm 3
-1	435 \pm 27	90 \pm 6	308 \pm 8	92 \pm 2	127 \pm 8	87 \pm 5
1	414 \pm 11	86 \pm 2	260 \pm 6	77 \pm 2	154 \pm 6	106 \pm 4
3	295 \pm 13	61 \pm 3	193 \pm 6	57 \pm 2	102 \pm 2	70 \pm 2
5	278 \pm 8	58 \pm 2	199 \pm 8	59 \pm 2	79 \pm 2	54 \pm 2
7	415 \pm 34	86 \pm 7	298 \pm 25	89 \pm 7	118 \pm 6	81 \pm 4
9	323 \pm 31	67 \pm 6	225 \pm 9	67 \pm 3	98 \pm 2	67 \pm 2
11	332 \pm 23	69 \pm 5	224 \pm 15	67 \pm 4	107 \pm 6	74 \pm 4
13	352 \pm 10	73 \pm 2	238 \pm 9	71 \pm 3	114 \pm 4	78 \pm 3
15	509 \pm 23	106 \pm 5	357 \pm 13	106 \pm 4	152 \pm 8	104 \pm 5
17	530 \pm 19	110 \pm 4	367 \pm 21	109 \pm 6	163 \pm 6	112 \pm 4
19	570 \pm 19	118 \pm 4	407 \pm 13	121 \pm 4	163 \pm 3	112 \pm 2
21	520 \pm 17	108 \pm 3	369 \pm 22	110 \pm 7	151 \pm 6	103 \pm 4
23	472 \pm 8	98 \pm 2	335 \pm 18	100 \pm 5	137 \pm 2	94 \pm 2
25	481 \pm 13	100 \pm 3	341 \pm 36	102 \pm 11	139 \pm 5	95 \pm 4

Tab. 26: Verlauf der absoluten und relativen Zellzahlen während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen, der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit und der Behandlung mit Desipramin (Versuch H3).

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht	
	Zellzahl/mm MW \pm SEM	%	Zellzahl/mm MW \pm SEM	%	Zellzahl/mm MW \pm SEM	%
-3	482 \pm 10	100 \pm 2	336 \pm 8	100 \pm 2	146 \pm 5	100 \pm 3
-1	508 \pm 28	105 \pm 6	358 \pm 25	106 \pm 7	150 \pm 6	103 \pm 4
1	438 \pm 15	91 \pm 3	297 \pm 10	88 \pm 3	141 \pm 6	97 \pm 4
3	325 \pm 16	68 \pm 3	224 \pm 10	67 \pm 3	101 \pm 7	70 \pm 5
5	341 \pm 42	71 \pm 9	255 \pm 39	76 \pm 12	86 \pm 3	59 \pm 2
7	416 \pm 24	86 \pm 5	300 \pm 19	89 \pm 6	116 \pm 6	79 \pm 4
9	334 \pm 13	69 \pm 3	231 \pm 10	69 \pm 3	102 \pm 4	70 \pm 3
11	309 \pm 7	64 \pm 2	207 \pm 5	62 \pm 1	102 \pm 5	70 \pm 4
13	330 \pm 12	69 \pm 2	217 \pm 8	65 \pm 2	113 \pm 5	78 \pm 3
15	427 \pm 21	89 \pm 4	301 \pm 13	90 \pm 4	126 \pm 9	86 \pm 6
17	500 \pm 21	104 \pm 4	337 \pm 16	100 \pm 5	163 \pm 6	112 \pm 4
19	471 \pm 6	98 \pm 1	321 \pm 6	96 \pm 2	150 \pm 4	103 \pm 3
21	488 \pm 14	101 \pm 3	343 \pm 14	102 \pm 4	145 \pm 5	100 \pm 4
23	452 \pm 12	94 \pm 2	316 \pm 10	94 \pm 3	136 \pm 3	93 \pm 2
25	474 \pm 26	98 \pm 5	327 \pm 17	97 \pm 5	147 \pm 10	101 \pm 7

10.3.2 Epitheldicken

Tab. 27: Durchschnittliche Dicken (D) des Gesamtepithels und der einzelnen Epithelschichten während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen und der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit (Versuch H0).

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht		Keratinschicht	
	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]
3	78 ± 2	100 ± 3	17 ± 1	100 ± 4	44 ± 2	100 ± 5	17 ± 1	100 ± 5
1	79 ± 4	102 ± 6	15 ± 1	89 ± 4	45 ± 3	103 ± 7	19 ± 1	115 ± 9
3	77 ± 11	100 ± 14	16 ± 2	91 ± 10	44 ± 7	101 ± 17	17 ± 2	104 ± 14
5	73 ± 2	94 ± 3	14 ± 1	83 ± 4	39 ± 1	89 ± 2	19 ± 1	118 ± 3
7	73 ± 4	95 ± 6	18 ± 1	103 ± 5	32 ± 4	74 ± 8	23 ± 1	141 ± 5
9	78 ± 3	101 ± 4	15 ± 1	88 ± 8	42 ± 2	96 ± 4	21 ± 2	126 ± 10
11	64 ± 5	83 ± 6	17 ± 1	99 ± 5	32 ± 3	73 ± 8	15 ± 2	92 ± 13
13	71 ± 5	91 ± 6	18 ± 1	102 ± 6	37 ± 3	86 ± 8	15 ± 2	94 ± 13
15	82 ± 6	106 ± 8	20 ± 1	119 ± 6	42 ± 4	97 ± 10	19 ± 2	117 ± 11
17	75 ± 6	97 ± 8	19 ± 1	108 ± 5	43 ± 4	99 ± 9	19 ± 2	117 ± 11
19	78 ± 6	101 ± 8	19 ± 1	109 ± 7	42 ± 4	96 ± 9	18 ± 1	106 ± 8
21	70 ± 6	91 ± 8	15 ± 1	88 ± 5	37 ± 4	86 ± 9	18 ± 2	106 ± 10
23	68 ± 2	88 ± 2	17 ± 1	100 ± 7	36 ± 2	82 ± 4	15 ± 1	91 ± 5
25	76 ± 4	98 ± 6	17 ± 1	96 ± 6	42 ± 3	97 ± 7	17 ± 1	102 ± 7

Tab. 28: Durchschnittliche Dicken (D) des Gesamtepithels und der einzelnen Epithelschichten während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen, der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit und der Behandlung mit Glutathion (Versuch H1).

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht		Keratinschicht	
	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]
-3	78 ± 2	100 ± 3	17 ± 1	100 ± 4	44 ± 2	100 ± 5	17 ± 1	100 ± 5
-1	79 ± 4	102 ± 1	17 ± 1	100 ± 4	45 ± 2	104 ± 5	16 ± 1	97 ± 8
1	61 ± 8	78 ± 2	12 ± 1	72 ± 5	34 ± 5	77 ± 12	15 ± 2	89 ± 15
3	77 ± 8	100 ± 2	16 ± 1	92 ± 7	40 ± 6	92 ± 13	21 ± 2	128 ± 10
5	92 ± 4	119 ± 1	17 ± 1	101 ± 8	49 ± 2	112 ± 5	26 ± 2	157 ± 12
7	74 ± 6	95 ± 1	16 ± 1	93 ± 5	36 ± 4	83 ± 10	21 ± 1	130 ± 8
9	71 ± 2	92 ± 0	15 ± 0	85 ± 2	39 ± 2	89 ± 4	18 ± 0	108 ± 1
11	76 ± 2	98 ± 0	19 ± 2	107 ± 9	40 ± 1	92 ± 2	17 ± 0	104 ± 2
13	73 ± 7	95 ± 2	19 ± 2	107 ± 9	38 ± 4	88 ± 10	16 ± 2	100 ± 11
15	77 ± 9	100 ± 2	19 ± 1	108 ± 6	40 ± 6	91 ± 14	19 ± 2	115 ± 11
17	74 ± 3	95 ± 1	17 ± 1	99 ± 3	35 ± 2	80 ± 5	21 ± 1	130 ± 8
19	85 ± 6	110 ± 1	18 ± 1	103 ± 3	47 ± 5	108 ± 11	20 ± 1	123 ± 7
21	76 ± 5	99 ± 1	17 ± 1	96 ± 7	42 ± 3	97 ± 7	18 ± 2	107 ± 12
23	77 ± 5	99 ± 1	16 ± 1	93 ± 9	43 ± 2	99 ± 6	17 ± 1	105 ± 7
25	74 ± 5	95 ± 1	16 ± 1	93 ± 6	43 ± 4	100 ± 9	14 ± 1	85 ± 5

Tab. 29: Durchschnittliche Dicken (D) des Gesamtepithels und der einzelnen Epithelschichten während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen, der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit und der Behandlung mit Fumonisin B1 (Versuch H2).

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht		Keratinschicht	
	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]
-3	78 ± 2	100 ± 3	17 ± 1	100 ± 4	44 ± 2	100 ± 5	17 ± 1	100 ± 5
-1	49 ± 2	63 ± 3	13 ± 0	75 ± 2	25 ± 2	56 ± 5	15 ± 2	89 ± 14
1	81 ± 8	105 ± 10	15 ± 1	88 ± 8	47 ± 4	107 ± 8	23 ± 3	140 ± 17
3	79 ± 3	103 ± 4	17 ± 1	96 ± 7	47 ± 2	106 ± 4	16 ± 1	99 ± 6
5	79 ± 7	103 ± 10	15 ± 1	87 ± 5	42 ± 3	95 ± 8	23 ± 3	137 ± 21
7	80 ± 6	103 ± 8	16 ± 1	93 ± 4	38 ± 4	87 ± 10	26 ± 2	157 ± 14
9	76 ± 6	98 ± 8	16 ± 2	92 ± 9	37 ± 4	84 ± 9	23 ± 2	140 ± 13
11	77 ± 6	100 ± 8	18 ± 1	105 ± 7	41 ± 4	93 ± 9	18 ± 2	110 ± 13
13	72 ± 6	92 ± 7	20 ± 2	114 ± 10	37 ± 3	84 ± 7	15 ± 2	92 ± 9
15	101 ± 6	130 ± 7	27 ± 2	154 ± 14	48 ± 2	111 ± 4	26 ± 3	157 ± 19
17	89 ± 7	115 ± 9	21 ± 2	122 ± 10	47 ± 3	107 ± 6	21 ± 3	128 ± 17
19	88 ± 3	113 ± 4	21 ± 1	122 ± 7	48 ± 2	109 ± 6	19 ± 1	115 ± 7
21	80 ± 4	103 ± 5	17 ± 1	100 ± 6	44 ± 2	101 ± 6	18 ± 2	110 ± 10
23	82 ± 4	105 ± 5	19 ± 1	111 ± 5	48 ± 2	109 ± 5	15 ± 1	91 ± 8
25	86 ± 4	110 ± 6	17 ± 1	100 ± 6	48 ± 3	110 ± 7	21 ± 3	125 ± 17

Tab. 30: Durchschnittliche Dicken (D) des Gesamtepithels und der einzelnen Epithelschichten während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen, der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit und der Behandlung mit Desipramin (Versuch H3).

Tag	Gesamtepithel		Germinativschicht		Funktionelle Schicht		Keratinschicht	
	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]	D ± SEM [µm]	D ± SEM [%]
-3	78 ± 2	100 ± 3	17 ± 1	100 ± 4	44 ± 2	100 ± 5	17 ± 1	100 ± 5
-1	71 ± 6	92 ± 8	15 ± 1	88 ± 6	37 ± 5	85 ± 11	19 ± 2	114 ± 12
1	86 ± 7	111 ± 8	15 ± 0	87 ± 1	51 ± 4	117 ± 10	20 ± 2	122 ± 14
3	99 ± 3	128 ± 4	18 ± 1	103 ± 4	57 ± 3	130 ± 7	24 ± 2	147 ± 15
5	73 ± 8	94 ± 10	16 ± 2	91 ± 10	39 ± 3	90 ± 8	18 ± 3	110 ± 20
7	83 ± 4	108 ± 5	17 ± 1	100 ± 6	43 ± 2	97 ± 4	24 ± 3	143 ± 17
9	76 ± 4	99 ± 5	17 ± 1	100 ± 6	43 ± 2	97 ± 6	17 ± 2	100 ± 11
11	83 ± 2	107 ± 3	17 ± 1	100 ± 4	45 ± 2	103 ± 4	21 ± 1	125 ± 6
13	94 ± 4	122 ± 5	19 ± 1	112 ± 6	57 ± 3	130 ± 6	18 ± 1	108 ± 9
15	87 ± 1	112 ± 2	20 ± 2	118 ± 9	47 ± 2	107 ± 4	19 ± 1	118 ± 8
17	84 ± 4	108 ± 5	18 ± 0	104 ± 0	48 ± 3	109 ± 6	18 ± 1	109 ± 9
19	80 ± 2	103 ± 2	18 ± 1	104 ± 5	45 ± 1	103 ± 2	17 ± 1	101 ± 7
21	84 ± 7	109 ± 10	17 ± 1	99 ± 8	50 ± 4	114 ± 10	17 ± 3	103 ± 16
23	80 ± 3	103 ± 4	16 ± 1	93 ± 7	48 ± 2	109 ± 4	17 ± 1	100 ± 8
25	86 ± 6	111 ± 8	18 ± 1	102 ± 6	50 ± 4	114 ± 9	18 ± 2	112 ± 11

10.3.3 Markierungsindex Ki-67

Tab. 31: Mittelwerte (n = 5) der Ki-67 positiven Zellen pro mm Zungenepithel. Verglichen werden die Werte der Kontrolle und der mit Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin behandelten Proben während einer fraktionierten Bestrahlung fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen und der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit.

Tag	Versuch H0		Versuch H1		Versuch H2		Versuch H3	
	MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM	
	Zellen/mm	[%]	Zellen/mm	[%]	Zellen/mm	[%]	Zellen/mm	[%]
-3	---	---	153 ± 8	32 ± 2	---	---	---	---
-1	153 ± 8	32 ± 2	128 ± 7	32 ± 14	153 ± 8	32 ± 2	153 ± 8	32 ± 2
1	24 ± 3	6 ± 2	43 ± 9	10 ± 4	---	---	---	---
3	69 ± 12	19 ± 9	66 ± 5	17 ± 8	61 ± 5	15 ± 1	49 ± 10	11 ± 2
5	94 ± 13	29 ± 13	112 ± 6	34 ± 15	---	---	---	---
7	179 ± 25	43 ± 19	151 ± 12	39 ± 17	115 ± 6	42 ± 2	173 ± 41	44 ± 5
9	69 ± 8	20 ± 9	88 ± 8	29 ± 13	182 ± 12	45 ± 4	277 ± 38	70 ± 9
11	120 ± 11	32 ± 14	98 ± 9	29 ± 13	---	---	---	---
13	146 ± 7	42 ± 19	138 ± 18	31 ± 14	113 ± 14	34 ± 3	114 ± 19	38 ± 6
15	281 ± 9	52 ± 23	167 ± 43	30 ± 13	---	---	---	---
17	193 ± 26	36 ± 16	114 ± 35	19 ± 8	---	---	---	---
19	113 ± 13	22 ± 10	150 ± 11	31 ± 14	---	---	---	---
21	110 ± 9	18 ± 8	121 ± 7	24 ± 11	---	---	---	---
23	127 ± 10	23 ± 10	157 ± 13	33 ± 15	---	---	---	---
25	119 ± 8	22 ± 10	132 ± 10	26 ± 11	---	---	---	---

10.3.4 Markierungsindex Caspase-3

Tab. 32: Mittelwerte (n = 5) der aktivierte Caspase-3 positiven Zellen pro mm Zungenepithel. Verglichen werden die Werte der Kontrolle und der mit Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin behandelten Proben während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen und der darauf folgenden Nachbeobachtungszeit.

Tag	Versuch H0		Versuch H1		Versuch H2		Versuch H3	
	MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM	
	Zellen/mm	[%]	Zellen/mm	[%]	Zellen/mm	[%]	Zellen/mm	[%]
-3	---	---	0,17 ± 0,06	0,04 ± 0,01	0,17 ± 0,06	0,04 ± 0,01	0,17 ± 0,06	0,04 ± 0,01
-1	0,17 ± 0,06	0,04 ± 0,01	0,26 ± 0,18	0,06 ± 0,04	0 ± 0	0 ± 0	0,06 ± 0,06	0,01 ± 0,01
1	0,21 ± 0,1	0,05 ± 0,02	0,43 ± 0,21	0,09 ± 0,05	0,36 ± 0,7	0,09 ± 0,02	0,13 ± 0,08	0,03 ± 0,02
3	0,05 ± 0,05	0,01 ± 0,01	0,06 ± 0,06	0,02 ± 0,02	0,11 ± 0,06	0,04 ± 0,02	0,17 ± 0,07	0,06 ± 0,02
5	0,26 ± 0,14	0,08 ± 0,04	0,67 ± 0,17	0,2 ± 0,05	0 ± 0	0 ± 0	0,57 ± 0,25	0,13 ± 0,04
7	1,04 ± 0,35	0,26 ± 0,09	1,00 ± 0,52	0,26 ± 0,14	0,98 ± 0,45	0,24 ± 0,11	1,44 ± 0,33	0,39 ± 0,1
9	0,66 ± 0,19	0,2 ± 0,06	1,02 ± 0,51	0,33 ± 0,17	0,67 ± 0,19	0,22 ± 0,06	0,66 ± 0,15	0,21 ± 0,05
11	0,62 ± 0,37	0,17 ± 0,09	0,73 ± 0,33	0,22 ± 0,1	0,84 ± 0,21	0,25 ± 0,06	0,96 ± 0,38	0,31 ± 0,12
13	1,42 ± 0,44	0,4 ± 0,11	1,48 ± 0,56	0,29 ± 0,09	0,81 ± 0,23	0,23 ± 0,06	1,57 ± 0,24	0,49 ± 0,08
15	2,04 ± 0,34	0,38 ± 0,06	1,08 ± 0,13	0,19 ± 0,03	2,58 ± 0,65	0,52 ± 0,13	1,54 ± 0,62	0,37 ± 0,15
17	1,27 ± 0,26	0,23 ± 0,04	0,41 ± 0,12	0,07 ± 0,02	1,24 ± 0,21	0,24 ± 0,04	0,91 ± 0,35	0,2 ± 0,07
19	0,85 ± 0,23	0,17 ± 0,04	0,52 ± 0,17	0,1 ± 0,03	0,35 ± 0,11	0,06 ± 0,02	0,37 ± 0,19	0,08 ± 0,04
21	0,18 ± 0,12	0,03 ± 0,02	0,39 ± 0,17	0,08 ± 0,04	0 ± 0	0 ± 0	0,21 ± 0,13	0,05 ± 0,03
23	0,13 ± 0,08	0,02 ± 0,01	0,28 ± 0,15	0,06 ± 0,03	0,1 ± 0,06	0,02 ± 0,01	0,11 ± 0,06	0,03 ± 0,02
25	0,33 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,69 ± 0,2	0,14 ± 0,04	0 ± 0	0 ± 0	0,06 ± 0,06	0,01 ± 0,01

10.3.5 Markierungsindex bcl-2

Tab. 33: Mittelwerte (n = 5) der bcl-2 positiven Zellen pro mm Zungenepithel. Verglichen werden exemplarisch Werte der Kontrolle und der mit Glutathion, Fumonisin B1 und Desipramin behandelten Proben während einer fraktionierten Bestrahlung mit 10 x 3 Gy/2 Wochen.

Tag	Versuch H0		Versuch H1		Versuch H2		Versuch H3	
	MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM		MW ± SEM	
	Zellen/mm	[%]	Zellen/mm	[%]	Zellen/mm	[%]	Zellen/mm	[%]
-3	---	---	0,86 ± 0,13	0,18 ± 0,05	0,86 ± 0,13	0,18 ± 0,05	0,86 ± 0,13	0,18 ± 0,05
-1	0,86 ± 0,13	0,18 ± 0,05	---	---	---	---	---	---
1	---	---	---	---	---	---	---	---
3	0,5 ± 0,25	0,14 ± 0,07	0,52 ± 0,28	0,14 ± 0,07	0,56 ± 0,20	0,19 ± 0,07	0,36 ± 0,06	0,12 ± 0,02
5	---	---	---	---	---	---	---	---
7	0,14 ± 0,14	0,03 ± 0,03	0,23 ± 0,10	0,06 ± 0,03	0,25 ± 0,11	0,06 ± 0,03	0,73 ± 0,34	0,18 ± 0,08
9	---	---	---	---	---	---	---	---
11	0,11 ± 0,06	0,03 ± 0,02	0,07 ± 0,07	0,02 ± 0,02	0,38 ± 0,18	0,1 ± 0,05	0,28 ± 0,15	0,09 ± 0,05

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. W. Dörr ganz herzlich für die Überlassung des Themas und die stets freundliche und umfassende Betreuung während der Durchführung und Anfertigung meiner Dissertation bedanken.

Mein Dank gilt auch der Sächsischen Aufbaubank, deren Stipendium aus Mitteln des ESF „Europäischen Sozialfonds“ die Durchführung des experimentellen Teils erst ermöglicht hat.

Ich danke auch der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie sowie dem Experimentellen Zentrum der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden für die Erlaubnis der Nutzung der Einrichtungen und die Zucht, Haltung und Pflege der Mäuse.

Ganz besonders möchte ich mich bei auch bei den Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie bedanken, insbesondere bei Fr. Dr. M. Schmidt für die Unterstützung während der experimentellen Arbeiten. Frau L. Stolz-Kieslich möchte ich ebenso herzlich für die Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate danken. Der herzliche Dank gilt auch allen lieben Kollegen im Labor, die hier nicht namentlich aufgeführt wurden.

Mein Dank gilt auch Dr. Veronique Limpert und Christiane Mey für den stets freundschaftlichen und kollegialen Austausch.

Ein ganz großes „Dankeschön“ geht vor allem an meine Familie, ohne deren Geduld und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre!

Technische Universität Dresden
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus
Promotionsordnung vom 24. Juli 2011

Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

- Herrn Prof. Dr. med. vet. et rer. medic. habil. Wolfgang Dörr, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden
- Frau Dr. rer. nat. Margret Schmidt, Frau Veronique Limpert, Frau Christiane Mey, AG Normalgewebe der „Experimentellen Strahlenbiologie“, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden
- Frau Dr. rer. nat. Cläre von Neubeck, Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden

3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht:

Großmann D, Schmidt M, Dörr W. 2013. Modulation der radiogenen Mucositis enoralis (Maus) durch Glutathion: Zur Bedeutung ceramidinduzierter apoptotischer Prozesse für die Schleimhautreaktion. Poster, 22. Symposium Experimentelle Strahlentherapie und Klinische Strahlenbiologie Dresden, 22.-23. Februar 2013

Großmann D, Schmidt M, Dörr W. 2013. Die Bedeutung der Ceramid-induzierten Apoptose für die radiogene Mucositis enoralis: Tierexperimentelle Untersuchungen. Poster, 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Radioonkologie Berlin 9.-12. Mai 2013

Dörr W, Bozsaky E, Grossmann D, Limpert V, Mey C & Schmidt M. 2013. The relevance of ceramide-induced apoptosis in oral mucositis – preclinical studies. Poster, 59. Jahrestagung der Radiation Research Society New Orleans, 15.-18.09.2013.

6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.

7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.

8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.

Dresden, 01.11.2017

Dana Großmann

Erklärung zur Einhaltung rechtlicher Vorschriften

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation

- ☐ das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen
- X die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes
Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben/zur Mitwirkung
24D-9198.11-1/2010-6
- ☐ die Einhaltung des Gentechnikgesetzes
- ☐ die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Dresden, 01.11.2017

Dana Großmann